

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovateli povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Imunologie



Bc. Adéla Dusilová

Porovnání tvorby cytokinů novorozeneckými leukocyty dětí zdravých a alergických matek

Comparison of cytokine production by leukocytes from newborns of healthy
and allergic mothers

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Jiří Hrdý

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 27.8.2012

Chtěla bych poděkovat svému školiteli RNDr. Jiřímu Hrdému za důsledné vedení během celého projektu a Prof. MUDr. Ludmile Prokešové, Csc. za potřebný nadhled a cenné rady. Dále pak za psychickou podporu své rodině a přátelům. A v neposlední řadě členům laboratoře za příjemnou atmosféru a pomocnou ruku při zpracování diplomové práce. Děkuji!

Diplomovou práci jsem vypracovávala v letech 2010 - 2012 na Ústavu imunologie a mikrobiologie, 1.LF UK v Praze v rámci grantů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy MSM 0021620806, Grantové agentury Karlovy Univerzity GAUK259911 a Výzkumných programů Karlovy Univerzity PRVOUK P25/LF1/2, SVV-2011-262506, SVV-2012-264506.

ABSTRAKT

Rostoucí incidence alergických onemocnění u dětí by mohla být způsobena senzibilizací nezralého imunitního systému během intrauterinního vývoje. Několik významných vědeckých prací prokázalo schopnost buněk pupečnickové krve odpovídat zvýšenou proliferací aktivitou na stimulaci běžnými alergeny.

V návaznosti na tyto poznatky předkládaná studie sleduje tvorbu cytokinů hrajících roli v pro i proti alergenním ladění imunitního systému. Buňky pupečnickové krve byly stimulovány polyklonálními aktivátory (fytohemagglutinin) a běžnými alergeny (ovalbumin, bojínek, bříza, roztoč). Následně pak byla sledována tvorba cytokinů využitím vybraných metod, které odrážejí různá stadia aktivace buňky - na úrovni mRNA pomocí kvantitativního real time PCR (qRT-PCR), detekcí přítomnosti intracelulárních cytokinů v jednotlivých buněčných subpopulacích průtokovou cytometrií a měřením koncentrace cytokinů v supernatantech kultur CBMC pomocí ELISA metody.

Dosažené výsledky poukazují na velmi slabou schopnost uvedených běžných alergenů (bojínek, bříza, roztoč, ovalbumin) stimulovat CBMC k tvorbě cytokinů sledovaných všemi uvedenými metodickými postupy. Ačkoliv jsme nepozorovali signifikantní rozdíly v produkci cytokinů (IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IFN- γ , TGF- β) CBMC po stimulaci alergeny (OVA, BOJ, BRI, ROZ) mezi skupinami dětí zdravých a alergických matek, byl zaznamenán trend k vyšším hodnotám tvorby cytokinů po polyklonální stimulaci (PHA) buňkami pupečnickové krve dětí alergických matek. Tato vyšší reaktivita CBMC dětí alergické skupiny odráží schopnost imunitního systému predisponovaného novorozence reagovat efektivněji, než je tomu u dětí zdravých matek.

Klíčová slova: mononukleární leukocyty, pupečnicková krev, alergie, alergeny, cytokiny, ELISA, real-time PCR, průtoková cytometrie

ABSTRACT

The increasing incidence of children suffering from allergic diseases could be caused by sensitization of immature immune system during the intrauterine development. Several important scientific papers have demonstrated the ability of cord blood cells to respond by elevated proliferation activity after stimulation by common allergens.

Following these findings, present study follows the production of cytokines which play a role in the pro- and anti-allergic tuning of the immune system. Umbilical cord blood cells were stimulated with polyclonal activators (phytohaemagglutinin) and common allergens (ovalbumin, timothy grass, birch, mite). Subsequently, cytokine production was monitored using selected methods that reflect different stages of cell activation - at the level of mRNA by quantitative real time PCR (qRT-PCR), by flow cytometry detection of the presence of intracellular cytokines in different cell subpopulations and by ELISA measurement of cytokines in CBMC culture supernatants.

The results obtained point to a very weak ability of these common allergens (timothy grass, birch, mite, ovalbumin) to stimulate CBMC to produce cytokines observed by all of these methodological procedures. Although we did not observe significant differences in CBMC cytokine production (IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IFN- γ , TGF- β) after stimulation with allergens (OVA, BOJ, BRI, ROZ) between the groups of healthy and allergic mothers, there was a trend towards higher levels of cytokine production after polyclonal stimulation (PHA) by umbilical cord blood cells of children of allergic mothers. This higher CBMC reactivity of children from allergic group reflects the ability of the immune system of predisposed newborns to respond more effectively than it works by children of healthy mothers.

Key words: mononuclear leukocytes, umbilical cord blood, allergy, allergens, cytokines, ELISA, real-time PCR, flow cytometry

OBSAH

ABSTRAKT	5
ABSTRACT	6
SEZNAM ZKRATEK	9
1 ÚVOD	10
2 PŘEHLED LITERATURY	12
2.1 ALERGIE	12
2.1.1 HISTORIE ALERGICKÉHO ONEMOCNĚNÍ	13
2.1.2 DEFINICE ALERGICKÉ REAKCE	14
2.1.3 ETIOLOGIE	18
2.2 PRENATÁLNÍ A PERINATÁLNÍ VZTAH MATKA - DÍTĚ	20
2.2.1 ONTOGENEZE HLAVNÍCH SLOŽEK IMUNITNÍHO SYSTÉMU HRAJÍCÍCH ROLI V ALERGII BĚHEM TĚHOTENSTVÍ	21
2.2.2 TH1 – TH2 PARADIGMA V TĚHOTENSTVÍ	26
2.2.3 IN UTERO SENZIBILIZACE	28
3 MATERIÁL A METODY	30
3.1 ZÍSKÁVÁNÍ MATERIÁLU A CHARAKTERISTIKA PACIENTŮ	30
3.2 IZOLACE MONONUKLEÁRNÍCH LEUKOCYTŮ Z KRVE	30
3.3 IMUNOENZYMATICKÝ PRŮKAZ CYTOKINŮ (ELISA)	32
3.4 IZOLACE RNA Z KULTUR POMOCÍ KITU “RNASY MINI KIT” (QIAGEN)	33
3.5 MĚŘENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY RNA	34
3.6 ELEKTROFORÉZA	34
3.7 REVERZNÍ TRANSKRIPCE	35
3.8 KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR (qRT-PCR)	36
3.9 INTRACELULÁRNÍ BARVENÍ BUNĚK CELÉ KRVE A JEJICH DETEKCE POMOCÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE	37
3.10 ROZTOKY	38
3.11 PŘÍSTROJE	39
3.12 SOFTWARE	39
3.13 STATISTICKÉ METODY	40
3.14 KOMERČNÍ KITY	40
3.15 STIMULÁTORY	40
3.16 SKLO A PLASTY	40
3.17 PROTILÁTKY	41

3.17.1	ELISA.....	41
3.17.2	PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE	41
4	VÝSLEDKY.....	42
4.1	STANOVENÍ EXPRESE GENŮ PRO VYBRANÉ CYTOKINY V KULTURÁCH CBMC DĚTÍ ALERGICKÝCH A NEALERGICKÝCH MATEK PO STIMULACI <i>IN VITRO</i> . qRT-PCR	42
4.2	DETEKCE PRODUKCE CYTOKINŮ BUŇKAMI PUPEČNÍKOVÉ KRVY DĚTÍ ALERGICKÝCH A NEALERGICKÝCH MATEK PO STIMULACI <i>IN VITRO</i> . PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE S INTRACELULÁRNÍM BARVENÍM	50
4.2.1	ANALÝZA VYHODNOCOVÁNÍ INTRACELULÁRNÍCH CYTOKINŮ	50
4.2.2	DETEKCE JEDNOTLIVÝCH CYTOKINŮ V CD4 ⁺ SUBPOPULACI T LYMFOCYTŮ..	52
4.3	MĚŘENÍ KONCENTRACE CYTOKINŮ V SUPERNATANTECH KULTUR CBMC DĚTÍ ALERGICKÝCH A ZDRAVÝCH MATEK PO STIMULACI <i>IN VITRO</i> . IMUNOENZYMATICKÁ METODA ELISA	64
5	DISKUZE	72
6	SOUHRN	78
7	SEZNAM LITERATURY.....	79

SEZNAM ZKRATEK

APC	antigen prezentující buňka (antigen-presenting cell)
BLG	protein z kravského mléka - alergen (betalactoglobulin)
BSA	bovinní sérum albumin
CBMC	mononukleární buňky pupečnickové krve (cord blood mononuclear cells)
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
Ct	hodnota hraničního cyklu (cycle threshold value)
DAG	diacylglycerol
DC	dendritická buňka (dendritic cell)
DMF	dimethylformamid
ELISA	imunoenzymatická esej (enzyme-linked immuno sorbent assay)
EMBP	hlavní bazický protein eozinofilů (eosinophil major basic protein)
FACS	průtokový cytometr/průtoková cytometrie (fluorescence-activated cell sorting)
FF	fyzilogický roztok pufrovaný fosfátem
FTS	fetální telecí sérum
GMCSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (granulocyte macrophage colony-stimulating factor)
HDM	alergen domácího roztoče (house dust mite)
HEPES	kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperaziny] ethansulfonová
IgM/E/D	imunoglobulin třídy M/E/D
IP3	inositol trifosfát
ITAM	aktivační motiv imunoreceptoru obsahující tyrozin (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)
LPS	lipopolysacharid
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
NK	přirození zabijáci (natural killers) - buňky

OD	optická hustota
OVA	ovalbumin
PAF	faktor aktivující krevní destičky (platelet-activation factor)
PAMP	molekulární vzory asociované s patogeny (pathogen-associated molecular pattern)
PBMC	mononukleární buňky periferní krve (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	fyziologický roztok pufrovaný fosfátem (Phosphate Buffered Saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PHA	fytohemagglutinin
PI3K	fosfatidyl inositol 3 kináza
PLC γ	fosfolipázaC γ
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (quantitative real-time PCR)
RNA	ribonukleová kyselina
SRS-A	pomalu reagující substance anafylaxe (slow reacting substance of anaphylaxis)
TAE	tris acetát
TBS	fyziologický roztok pufrovaný Tris (Tris Buffered Saline)
TCR	receptor T lymfocytu (T-cell receptor)
TLR	receptor přirozené imunity (toll like receptor)
TMB	3,3'-5,5'-tetramethylbenzidin
Treg	T regulační buňky

1 ÚVOD

Stupňující se rozšíření atopických onemocnění v průběhu posledních desetiletí (Nakagomi *et al.*, 1994) ve spojení s prudce vzrůstajícími sociálními a ekonomickými náklady na léčbu alergií (Smith *et al.*, 1997) zesílilo potřebu tento trend zastavit či dokonce obrátit. Zvláštní zájem je věnován rostoucí potřebě po vývoji primární strategie prevence. Esenciální pro tento přístup je jasné porozumění imunologickým procesům v rané fázi života jedince, které podporují Th2 polarizovanou atopickou senzibilizaci. Současně s imunitními mechanismy účastnicími se vzniku alergie je třeba adresovat také environmentální faktory, vystavení alergenům, výživové aspekty, epigenetické vlivy, chování matky v období těhotenství a další. Důležitost rozpoznání novorozenců s rizikem rozvoje alergie v pozdějším věku hraje důležitou roli pro cílenou prevenci.

Již několik desítek let hledají různé vědecké skupiny spolehlivý prognostický znak poukazující na zvýšené riziko vzniku alergie. Ačkoliv zvýšená hladina IgE v pupečnickové krvi je spojená s rozvojem alergie a astmatu (Croner and Kjellman, 1986), po více než 20 letech výzkumu (Michel *et al.*, 1980) je dnes ve velké míře akceptováno, že rodinná genetická zátěž je zatím tím nejspolehlivějším prognostickým znakem pro vznik alergie (Kjellman, 1994).

Tato práce si klade za cíl rozšířit v naší laboratoři již dříve prokázanou vyšší proliferální aktivitu a produkci imunoglobulinů buňkami pupečnickové krve dětí alergických matek po stimulaci fytohemaglutinem (PHA) (Zizka *et al.*, 2007) o sledování změn produkce cytokinů po kultivaci s tímto nespecifickým polyklonálním aktivátorem a specifickými stimulatory (alergeny) mezi skupinami dětí zdravých a alergických matek. Dále srovnání reaktivity pomocí tvorby cytokinů hrajících roli v pro a proti alergickém ladění imunitního systému buněk pupečnickové krve u skupin s různým rizikem rozvoje alergie pomocí vybraných metod odrážejících odlišná stadia aktivace buňky na úrovni genové exprese cytokinů (qRT-PCR), intracelulárním barvením cytokinů pupečnickové krve *in vitro* (stanovení procentuálního zastoupení buněk pozitivních pro daný cytokin v CD4⁺ subpopulaci T lymfocytů pomocí průtokové cytometrie) a měřením koncentrace cytokinů v supernatantech kultur mononukleárních leukocytů pupečnickové krve (CBMC) (ELISA). V neposlední řadě pak posouzení možnosti prenatální stimulace alergenem na základě specifické stimulace CBMC několika nejběžnějšími alergeny (bojínek, bříza, roztoč, ovalbumin).

Poznatky získané v této studii by mohly sloužit jako příspěvek k hledání prognostických znaků indikujících budoucí rozvoj alergie. Dosavadní výsledky získané v této oblasti jsou značně rozporuplné a jejich posouzení a interpretace vyžadují další podrobnější studium a testování velkého množství jedinců s různým stupněm rizika pozdějšího vzniku alergie.

2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 ALERGIE

Alergie je moderní onemocnění. Ještě před sto lety toto slovo ani neexistovalo a příznaky byly charakterizovány jako přecitlivělost na přírodu (senná rýma, astma, orální potravinová intolerance) rutinně považovaná za vzácnou a nefatální, primárně se objevující v kulturních a civilizovaných západních společnostech. Do konce 20. století byla ovšem alergická onemocnění přehodnocena kliniky, společností a médii jako rozšířená a potenciálně fatální. Navíc alergie podnítily vznik oddělených klinických specializací a vytvořily nové diagnostické a terapeutické strategie.

Alergie se stala představitelem moderních civilizačních chorob, které nejen odráží podstatné změny v moderním životním stylu, ale také souvisí se zhoršením kvality životního prostředí na přelomu milénia.

V posledních dekáдах vědci, lékaři a epidemiologové objevili mnoho nového o podstatě alergických reakcí. Na konci 20. století máme detailní a sofistikované znalosti o etiologii a patogenezi řady alergických onemocnění - o buněčných a intracelulárních mechanismech (úloha T buněčných subpopulací a interleukinů) zapojených v alergických reakcích, geografickém a historickém rozšíření alergií a genetiky (Kay, 2000). A co více, farmaceutické společnosti vyvinuly značný arsenál terapeutických prostředků a léčebných protokolů speciálně navržených k boji se sennou rýmou, ke kontrole astmatu, zmírnění kožních a potravinových alergií. Tento rapidní nárůst vědomostí, zlepšení v klinické praxi a zvyšující se produkce a spotřeba protialergických léků společně odrážely rostoucí lékařský, veřejný a mediální zájem. Tento nárůst je označován jako „mor“ nebo „epidemie“ alergických onemocnění postihujících moderní civilizaci (Jackson, 2001).

Navzdory nedávnému posunu ve výzkumu alergie zůstávají enigmatické. Už Warren Vaughan, jeden z hlavních alergologů poloviny dvacátého století, navrhl před mnoha lety, že alergie je vlastně „zvláštní choroba“, která i na začátku 21. století v sobě stále ztělesňuje hodně záhadného a matoucího. Pořád nemáme žádné jasné vysvětlení pro zvyšující se incidenci, rozšíření a v některých případech i úmrtnosti alergických onemocnění v moderní společnosti, specifická etiologie mnoha alergických příznaků u jednotlivých pacientů často zůstává nepostižitelná, povaha interakcí mezi genetickými a environmentálními faktory vyžaduje hlubší výzkum (Jackson, 2001).

2.1.1 HISTORIE ALERGICKÉHO ONEMOCNĚNÍ

Ačkoliv choroby nyní běžně považované za alergické - jako senná rýma a astma, byly popsány a studovány mnoho let před 20. stoletím, jejich etiologie a patogeneze zůstávají v obecné rovině obskurní. Termín „astma“ byl volně používán k popisu dechových obtíží od dob antiky, pochází z řeckého slova a znamená „krátkodechost“. V té době se astma považovalo v podstatě pouze za symptom a bylo nedůsledně odlišováno od jiných respiračních onemocnění. Až v 19. století, kdy byly vyvinuty nové vyšetřovací techniky, jako například stetoskop, bylo zjištěno, že bronchiální astma má závažnější diagnostický význam (Brevis, 1990/1991). V podobném duchu se nesl objev původce senné rýmy. Ta byla poprvé popsána Johnem Bostockem v roce 1819 a po mnoho let se považovala za idiosynkratickou odpověď na širokou škálu nespecifických stimulů. (Bostock, 1819; Emanuel, 1988). I poté, co Charles Blackley v roce 1873 úspěšně prokázal, že pyl, spíše než teplo, světlo, různé pachy či ozón, je tím reakční agens, senná rýma byla pokládána za důsledek reakce nosu a očí na pylové toxiny, analogické k reakci na bakteriální toxiny v nové mikrobiální teorii původu onemocnění (Waite, 1995).

Na počátku 20. století prošly medicínské přístupy k senné rýmě, astmatu, kožním problémům a potravinovým alergiím zásadní transformací. V roce 1906 Clemens von Pirquet, rakouský pediatr, představil světu pojem „alergie“, popisující jakýkoliv stav změněné imunologické reaktivity, který způsobuje zvýšení reaktivity imunitního systému či hypersenzitivitu. Termín „alergie“ pochází z řeckého „allos ergos“, což znamená „jiná reakce“. Hlavním cílem Pirquetova sofistikovaného filozofického přístupu bylo poskytnout sjednocující rozumový sémantický rámec, který by pomohl při analýze a klasifikaci rozličných imunologických fenoménů zahrnujících imunitu proti patogenům, sérovou nemoc, anafylaxi a ostatní supersenzitivní reakce, které byly poprvé popsány na počátku století. Pirquetova práce přitáhla pozornost a významně přispěla k výzkumu vznikajícího odvětví imunologie a k rostoucímu zájmu vědců o odhalení fenoménu biologické specifity (Silverstein, 1979). Bohužel výzkum alergické reaktivity přitahoval málo pozornosti z řad klinické společnosti, takže zůstával esoterickým vědeckým polem experimentální fyziologie. Dokonce i pochopení faktu, že senná rýma a astma sdílejí mnohé patologické znaky spolu navzájem a i s fenoménem experimentální anafylaxe u zvířat, nevzbudilo u kliniků žádné nadšení, protože tato onemocnění byla považována v té době za poměrně vzácná a nefatální (Meltzer, 1910). Ačkoliv incidence senné rýmy se

evidentně zvyšovala, byla primárně považována za onemocnění mírné a nepříliš běžné, výskytem omezující se na vzdělané a civilizované třídy a rasy (Mackenzie, 1887).

Ve srovnání s naléhavějšími problémy veřejného zdraví, sociální ekonomiky a politické situace, které byly asociované s mortalitou infekčních chorob, obavami o fitness bojujících jedinců a vysokou úmrtností dětí a matek na začátku 20. století ve všech evropských zemích, zůstávala alergická onemocnění jako senná rýma a astma na okraji zájmu. Nicméně detailní práce dr. Pirqueta a ostatních objasnily imunitní mechanismy zapojené v astmatu, senné rýmě a potravních alergiích, které pomohly následně v rozkvětu klinické imunologie na obou stranách Atlantického oceánu na začátku 20. století (Jackson, 2001).

2.1.2 DEFINICE ALERGICKÉ REAKCE

Pojem alergie bývá často zaměňován za pojem atopie. Atopie se definuje jako genetická predispozice k alteraci imunitní odpovědi v imunopatologickou reakci I. typu. Pojem alergie představuje klinickou manifestaci atopie. O atopii tedy hovoříme ve smyslu genetické zátěže, která tvoří jeden z mnoha vlivů na rozvoj multifaktoriálního onemocnění, jakým alergie bezesporu je.

V roce 1963 vzniklo rozdělení hypersenzitivních reakcí na typ I - IV podle Philipa Gella a Robina Coombse. V této nové klasifikaci „alergie“ odpovídala typu I hypersenzitivity také označované jako přecitlivělost časného typu zprostředkovaná IgE protilátkami v odpovědi na alergeny. Alergeny jsou proteiny se schopností interagovat s imunitním systémem svými antigenními determinantami. První setkání s alergenem je nazýváno senzibilizací. Tehdy dochází k podobné imunitní reakci jako při obraně proti patogenu.

2.1.2.1 SENZIBILIZACE ALERGENEM

Antigeny vstupují do těla přes slizniční povrchy, zejména respiračního a gastrointestinálního traktu a kůží. Alergeny např. hmyzí jedy mohou ale vstupovat do těla i krevní cestou. Alergenní proteiny jsou pohlceny endocytózou zprostředkovanou receptorem, makropinocytózou, fagocytózou nebo inkorporací mikroveziklů obalených povrchem sousední buňky a nebo interakcí s nanovezikly nebo exozomy menšími než 100 nm buňkami prezentujícími antigen (APC), jako jsou monocyty, makrofágy, bazofilní granulocyty a dendritické buňky indukující primární imunitní odpověď (Morelli *et al.*, 2004). Antigen je v APC pomocí ubiquitinylace rozložen v endosomu na kratší úseky o délce několika aminokyselin. Tímto procesem dochází k odhalení specifických částí molekul alergenu nazývaných antigenní determinanty nebo epitopy (Wang and

Maldonado, 2006). Ty jsou pak vystaveny na povrchu APC v komplexu s MHC glykoproteiny II. třídy a prezentovány T lymfocytům. Bakteriální antigeny spíše podporují rozvoj Th1 imunitní odpovědi charakterizované hlavně produkcí IFN- γ , která vyúsťuje ve vznik obraných reakcí zprostředkovaných buněčně. U atopických jedinců jsou v přítomnosti kostimulačního signálu naivní T buňky konvertovány na aktivované CD4⁺ Th2 buňky. T lymfocyty hrají centrální roli v organizaci alergické reakce. Th2 buňky produkují cytokiny jako IL-4 a IL-13. Atopičtí jedinci mají v cirkulaci více T buněk specifických k určitému alergenům sekretujících IL-4. Ty dokonce produkují jednou buňkou více IL-4, než tomu je u zdravých jedinců. Tyto cytokiny pak způsobují proliferaci B buněk a izotypový přesmyk na IgE protilátky, které jsou produkovány plazmatickými buňkami a jsou specifické pro daný antigen. Izotypový přesmyk je biologický fenomén, kdy se mění protilátky produkovány B buňkami z jedné třídy na jinou. Během procesu dochází ke změně konstantní oblasti těžkého řetězce, ale variabilní region těžkého řetězce zůstává nezměněný, což zaručuje stejnou antigenní specifitu (Lorenz *et al.*, 1995). Aktivace a izotypový přesmyk na IgE jsou indukované IL-4 a IL-13 (1. signál) a interakcí CD40 na B buňkách a CD40L na Th2 buňkách (2. signál). Oba tyto signály přenášejí své působení do buňky přes rodinu Janus tyrozinových kináz JAK1 a JAK3, které vedou k fosforylaci transkripčního regulátoru STAT6 (Siemasko *et al.*, 1998). Po aktivaci alergenů produkují Th2 CD4⁺ T lymfocyty spektrum cytokinů (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13), které indukují eozinofily a zvýšenou hladinu sérového IgE, což má za následek manifestaci klinických symptomů (Bellanti, 1998). Přibližně 20% populace, která se setká s alergenem, bude tvořit specifické IgE. Z některých specificky stimulovaných B buněk se pak stávají dlouho žijící paměťové buňky.

2.1.2.2 NÁSLEDNÉ SETKÁNÍ S ALERGENEM

Imunoglobulin E a jeho receptory - vysokoafinní Fc ϵ RI a nízkoafinní Fc ϵ RII (CD23) jsou klíčovými komponenty časného typu alergické reakce (Gould and Sutton, 2008). Nově byl objeven třetí IgE receptor, který byl původně pojmenován „ ϵ vázající protein“, dnes známý pod názvem galektin-3 (Yamaoka *et al.*, 1995). Tento receptor je přítomný na neutrofilních granulocytech, kde hraje roli v aktivaci těchto buněk (Truong *et al.*, 1993) a je také exprimovaný na buňkách trofoblastu placenty (Jeschke *et al.*, 2007)

IgE efektivně aktivuje alergickou kaskádu přes vysokoafinní receptor na epidermálních Langerhansových buňkách, eozinofilech, žírných buňkách a bazofilech. Fc ϵ RI je členem imunoglobulinové superrodiny receptorů a skládá se z podjednotek α , β , $\gamma 1$ a $\gamma 2$

(Abramson and Pecht, 2007). α řetězec s imunoglobulinovou doménou a β podjednotka se účastní vazby IgE a $\gamma 1$ a $\gamma 2$ přispívají k fosforylačnímu procesu (Kraft *et al.*, 2007). Lidé exprimují tetramerní Fc ϵ RI (Fc ϵ RI $\alpha\beta\gamma 2$) na žírných buňkách a bazofilech a trimerní formu (Fc ϵ RI $\alpha\gamma 2$) na APC (Call and Wucherpfennig, 2005). Vazbou IgE na tento receptor na buněčném povrchu vzniká komplex IgE–Fc ϵ RI, který je stabilní (MacGlashan, 2005). Vazba alergenu na tento komplex způsobí aktivaci ITAM motivu receptoru, který dále spouští kaskádu signálů zahrnujících Src kinázovou rodinu (Lyn, Syk a Fyn kinázy) a další molekuly. Na jejím konci dochází k indukci DAG a IP3 molekul pomocí PLC γ a PI3K, což vede k uvolnění Ca^{2+} z intracelulárních depositů a degranulaci žírných buněk nebo bazofilů (Hübner *et al.*, 2011). Tato reakce je velice rychlá, od prokřížení specifických IgE protilátek po vylití mediátorů a objevení prvních příznaků neuplyne více než několik minut.

2.1.2.3 MEDIÁTORY ALERGICKÉ REAKCE

Degranulací žírných buněk a bazofilních granulocytů dochází téměř okamžitě k uvolnění primárních (preformovaných) mediátorů uskladněných v granulech histaminu, chemotaktického faktoru eozinofilů pro anafylaxi, heparinu a proteolytických enzymů. Sekundární mediátory - prostaglandiny, cytokiny (IL-4, IL-5, TNF- α), leukotrieny, bradykinin, pomalu reagující substance anafylaxe (SRS-A), faktor aktivujícího krevní destičky (PAF) a další - musí být teprve vytvořeny, a proto se uvolňují s určitým zpožděním (Kumar *et al.*, 2012).

Tyto mediátory mohou způsobit dilataci hladkých svalů, disrupci kapilár, lokální otok a další alergické symptomy. U některých jedinců se můžeme setkat s velice agresivní a prudkou reakcí vedoucí k anafylaxi a někdy končící smrtí.

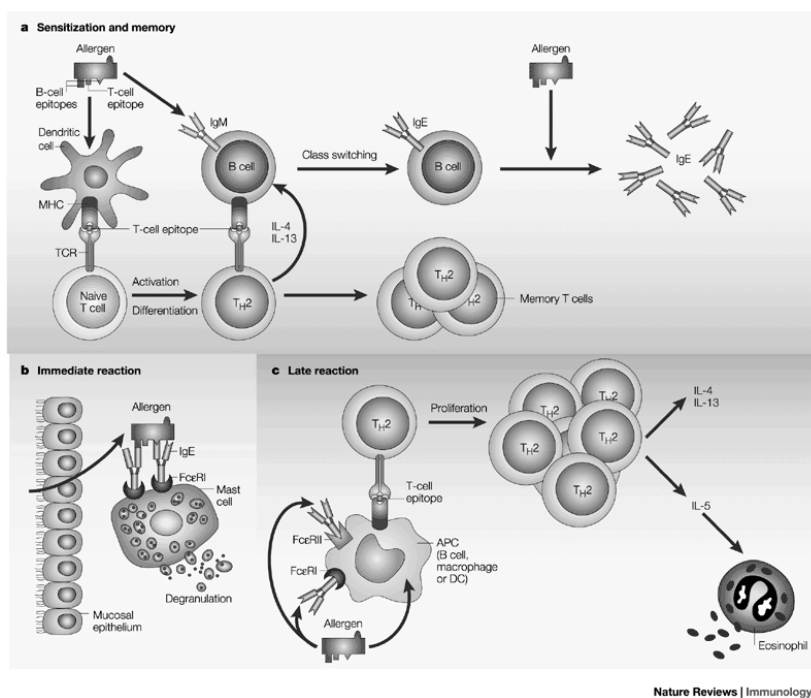
Histamin působí přes své receptory H1 a H2 a způsobuje kontrakci hladké svaloviny dýchacích cest a gastrointestinálního traktu, zvyšuje vazopermeabilitu a vazodilataci, podporuje produkci hlenu, svědění, kožní vazodilataci a sekreci žaludečních kyselin (Jutel *et al.*, 2001).

Hlavní proteáza uvolňovaná žírnými buňkami je tryptáza. Její přesná role je stále předmětem výzkumu, ví se však, že štěpí proteiny komplementové dráhy C3, C3a a C5 (Fukuoka *et al.*, 2008). Tryptáza se nachází ve všech lidských žírných buňkách a ještě dalších buňkách, je tedy dobrým znakem aktivace mastocytů.

Při degranulaci dochází k vylučování proteoglykanů - heparinu a chondroitin sulfátu. Role druhého zmiňovaného v alergické reakci nebyla ještě objasněna, heparin se zdá být důležitý pro uchování preformovaných proteáz a pro produkci tryptázy (Noga *et al.*, 1999).

Chemotaktické faktory atrahují do místa zánětu eozinofily a neutrofile. Eozinofily uvolňují hlavní bazický protein eozinofilů (EMBP), který spolu s aktivitou neutrofilů může způsobit výrazné poškození tkání v pozdní fázi alergické reakce.

Mezi uvolňované látky patří také cytokiny. IL-4, který stimuluje a podporuje proliferaci Th2 buněk a izotypový přesmyk na IgE (Hart, 2001). IL-5 je klíčovou molekulou ve vyžrávání, chemotaxi, aktivaci a přežití eozinofilů. IL-5 dále pomáhá bazofilům v uvolnění histaminu a leukotrienů. IL-6 podporuje produkci hlenu. IL-13 má podobnou funkci jako IL-4. TNF- α aktivuje neutrofile, zlepšuje chemotaxi monocytů, zesiluje produkci cytokinů T buňkami (Pearlman, 1999).



Nature Reviews | Immunology

Obrázek 1

část a) Senzitivace a paměť. První kontakt s odezvou v řádu minut, kdy rozpustný alergen (allergen) na slizničním povrchu (mucosal epithelium) dýchacího traktu, je pohlcen a zpracován buňkou prezentující antigen (APC) např. dendritickou buňkou (dendritic cell) nebo B buňkou (B cell). Následuje aktivace Th2 imunitní odpovědi (activation, differentiation) a poté sekreci cytokinů IL-4 a IL-13, které způsobují izotypový přesmyk (class switching) u protilátek produkovaných B buňkou na IgE. Tento proces se nazývá senzibilizace (sensitization) a vede ve svém důsledku ke vzniku paměťových (memory) B buněk a alergen specifických paměťových T buněk. Pozdější opakované setkání s alergenem vede k sekreci zvýšeného množství protilátek IgE specifických pro určitý alergen B buňkou při současné pomoci od T buňky. Ty jsou následně zachyceny na povrchu žírných buněk (mast cells), monocytů, dendritických buněk a B buněk na FcRI (vysokoafinním IgE receptoru) a FcRII (nízkoafinním IgE receptoru).

část b) Časná reakce. Prokřížení receptorů IgE na povrchu efektorových buněk alergenem vede k uvolnění biologicky aktivních mediátorů (histaminu, leukotrienů) degranulací (degranulation) a k časným (immediate) příznakům alergie.

část c) Pozdní reakce. Ta je způsobená prezentací alergenů T buňkám, které se aktivují, prolifерují (proliferation) a uvolňují prozánětlivé cytokiny (IL-4, IL-5 a IL-13). Tento proces může být zesílen IgE mediovanou prezentací alergenů T buňkám. Th2 cytokiny (například IL-5) způsobují tkáňovou eozinofilii a produkci prozánětlivých mediátorů eozinofilů (eosinophil).

Převzato z: Valenta and Kraft (2002).

2.1.3 ETIOLOGIE

Atopie souvisí s tendencí pacientů být více vnímaví k alergenům. Je to multigenně podmíněná autozomálně přenosná vloha. Tedy incidence alergie u pacientů s rodinnou genetickou zátěží je prokazatelně vyšší než u jedinců bez ní. Tato teorie byla ověřena několika studiemi na monozygotních a dizygotních dvojčatech. Jednotlivé výzkumy sice přišly s odlišnými procentuálními shodami rozvoje alergie mezi dvojčaty, nicméně souvislost zde byla prokázána. Atopická onemocnění zahrnují ekzém, alergický zánět spojivek, sennou rýmu a astma.

Alergie samotná je komplexní choroba ovlivňovaná jak dědičnými, tak environmentálními faktory, které představují jak vlivy prostředí během těhotenství (kouření (Noakes *et al.*, 2006), mikrobiální infekce (Ege *et al.*, 2006), vystavení alergenům, výživa matky (Devereux *et al.*, 2002)), tak následné okolnosti v dětství. Hygienická hypotéza vyjadřuje myšlenku, kdy ve vyspělých státech světa je vyvíjející se imunitní systém ochuzen o mikrobiální antigeny prostředí, které aktivují Th1 odpověď. Tento nedostatek stimulace zvyšuje výskyt atopických onemocnění. Opačným přístupem bylo ověřeno, že děti žijící ve svém raném dětství na farmě s dostatkem antigenních stimulů, mají nižší riziko rozvoje následné atopie (Alfvén *et al.*, 2006).

Právě vliv mikrobiální infekce během těhotenství vedl ke vzniku teorie o účasti přirozené imunity při vývoji alergického onemocnění během těhotenství. Komponenty přirozené imunity jsou schopné rozpoznávat molekulární vzory asociované s patogeny (PAMP) pomocí různých druhů evolučně konzervovaných receptorů. Následné signalizační kaskády pak spouští prozánětlivé odpovědi a vedou k velmi rychlé eradikaci mikrobů. Skupina Prof. Prescott (2011) prokázala rozdílnou míru aktivace receptorů přirozené imunity z rodiny TLR (Toll-like receptorů) u novorozenců alergických a zdravých matek ve srovnání s dospělými jedinci. Alergická skupina reagovala vyvoláním prudší prozánětlivé reakce, zatímco u zdravé skupiny docházelo k vyrovnávání funkce těchto receptorů až s věkem. Také bylo prokázáno, že receptor TLR4, který normálně slouží k rozpoznávání lipopolysacharidu (LPS) - složky buněčné stěny G^+ bakterií- je schopný rozpoznat a vázat i alergeny buď na LPS navázané nebo pomocí jejich strukturní homologie (Der p 2 - alergen roztoče domácího) (Trompette *et al.*, 2009).

Většina genů, které byly vyšetřovány v souvislosti s vlivem na dědičnost alergického onemocnění, jsou spojené s přirozenou imunitou. CD14, koreceptor pro TLR4 pomáhající rozpoznat a vázat LPS, je pravděpodobně ten nedůkladněji studovaný gen vrozené imunity,

jehož polymorfismus má vliv na alergii (Prescott and Clifton, 2009). Další geny podezřelé z účasti na rozvoji atopie jsou geny pro IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 a GM-CSF (faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů) na chromosomu 5q31-33, dále pro β podjednotku IgE vysokoafinního receptoru na chromosomu 11q, MHCII na 6p, IFN- γ na 11q, TCR na 13q a 14q (Denham *et al.*, 2008).

V současnosti velmi diskutovaným tématem jsou epigenetické regulace během intrauterinního vývoje a jejich vliv na rozvoj alergického fenotypu. Hlavní roli hrají hlavně změny v methylaci DNA a histonů a acetylaci histonů. Tyto dva mechanismy regulují genovou expresi změnou kompaktnosti a přístupnosti DNA pro transkripční faktory (Song *et al.*, 2009). Existují jasné důkazy o tom, že diferenciace T buněk (Janson *et al.*, 2009) zahrnující Th1 vs Th2 (Fields *et al.*, 2002) je pod epigenetickým dohledem, stejně jako exprese FoxP3, transkripčního faktoru T regulačních buněk (Treg) (Polansky *et al.*, 2008) a celý jejich vývoj, ještě spolu se vznikem populace Th17 buněk (Koenen *et al.*, 2008).

Hlavním epigenetickým mechanismem je methylace promotoru genu pro IFN- γ , což reguluje vývoj Th1 buněčné populace. Při jeho hypermethylaci (velmi nízké expresi) u neonatálních CD4⁺ T buněk téměř nedochází k produkci IFN- γ . Se zvyšujícím se věkem ale progresivně demethyluje a tím vzrůstá množství IFN- γ (White *et al.*, 2002). Podobný mechanismus zahrnující methylaci se uplatňuje i u exprese FoxP3 a diferenciaci Treg buněk (Polansky *et al.*, 2008).

Dalším majoritním regulačním mechanismem je acetylaci histonů. Odstranění acetylové skupiny histon deacetylázou obecně vede k umlčení genu, zatímco přidání acetylu histon acetyl transferázou otevírá chromatinovou strukturu a tím umožňuje transkripci genů v daném místě (Bhavsar *et al.*, 2008). Vlivy, které inhibují histon deacetylázy jako například oxidativní stres, zvyšují produkci Th2 cytokinů (IL-13 a IL-5) a GATA3 (transkripční faktor zodpovědný za fenotyp Th2) T buněčné odpovědi (Su *et al.*, 2008). Th17 buněčná linie se zdá být regulována podobným epigenetickým mechanismem (Koenen *et al.*, 2008).

Tato zjištění vedla ke zvýšení zájmu o faktory, které by mohly podporovat sklon k alergiím zvýšením acetylaci histonů (podpora Th2) a/nebo vzrůstem genové methylaci (umlčení Th1 a Treg) (Miller and Ho, 2008).

Klasickou otázkou, na kterou hledá odpověď mnoho rozsáhlých studií, je míra vlivu dědičnosti atopie ze strany otce a matky. Dlouhé kontroverze zřehlednil článek Litonjua *et al.* (1998), který vzal v potaz rodiče s diagnostikovaným astmatem, sennou rýmou a ekzémem a jejich vliv na pozdější průkazný rozvoj astmatu u dětí do 3,5 roku věku.

Genetická zátěž ze strany matky měla na následné alergické onemocnění společného potomka signifikantně větší vliv než při zátěži pouze ze strany otce. Zde je třeba diskutovat i působením mateřského prostředí během těhotenství, kde spolupůsobí mnoho faktorů, které by mohly přispívat k rozvoji alergického fenotypu (in utero senzibilizace, environmentální vlivy, buněčný mikrochimerismus, ...).

Také druh porodu hraje roli v pozdější rozvoji alergie. Při vaginálním porodu prochází novorozenec porodními cestami matky, kde dochází k první kolonizaci mateřskou mikroflórou. Při císařském řezu, který značí signifikantní 60% zvýšení rizika rozvoje alergického zánětu spojivek a astmatu speciálně u novorozenců ženského pohlaví, dochází ke kolonizaci později a spektrum kolonizujících bakterií je odlišné (Renz-Polster *et al.*, 2005).

2.2 PRENATÁLNÍ A PERINATÁLNÍ VZTAH MATKA - DÍTĚ

Během těhotenství je matka vystavena různým vlivům prostředí, které ve svém důsledku mohou mít vážný dopad na vývoj plodu s přetrvávajícími následky pro budoucí zdraví a vnímavost k chorobám. V současné době dochází ke zvýšení zájmu o to, jak novodobé změny prostředí ovlivňují rozvoj imunitního systému plodu a jak přispívají k současné epidemii alergie a ostatních onemocnění spojených s poruchou imunitního systému. Zvyšující se míra alergických onemocnění objevujících se již během raného dětství, spolu s presymptomatickými rozdíly ve funkci imunitního systému již při narození podporují hypotézu, že prenatální podmínky hrají významnou roli ve vývoji nemoci (Prescott, 2010). Množství environmentálních vlivů (např. strava, vystavení vlivu mikrobů, kouření matky, ...) v těhotenství může modifikovat imunitu plodu. Existují již dokonce alarmující důkazy na zvířecích modelech, že tyto podmínky během těhotenství mohou mít epigenetické následky při expresi genů imunitního systému a tímto ovlivňují náchylnost k alergickým onemocněním dýchacích cest (Hollingsworth *et al.*, 2008). Dokonce existence genetického polymorfismu ještě dále posouvá individuální náchylnost k efektům okolního prostředí, což jen zvýrazňuje komplexitu interakcí genů a prostředí v této rané fázi života. Všechna tato zjištění jen podtrhují nutnost dalšího výzkumu k pochopení patogeneze a zvyšující se incidence alergického onemocnění a odhalení prognostických znaků signalizujících budoucí rozvoj alergie.

2.2.1 ONTOGENEZE HLAVNÍCH SLOŽEK IMUNITNÍHO SYSTÉMU HRAJÍCÍCH ROLI V ALERGII BĚHEM TĚHOTENSTVÍ

Běžnou mylnou představou je, že novorozenec se rodí imunologicky naivní. Neonatální lidské T buňky ale při stimulacích antigeny - alergenů (Prescott *et al.*, 1998), autoantigeny (Yu *et al.*, 1995) či antigeny parazitů (Novato-Silva *et al.*, 1992) proliferují. Také to, že je možné detekovat v pupečnickové krvi IgE specifické k danému alergenů, ukazuje, že novorozenecké T a B buňky jsou schopné odpovědi proti danému antigenu (Oryszczyn *et al.*, 1999; Peters *et al.*, 2009). Velice podobně bylo ukázáno, že i novorozenci matek, které byly očkovány proti tetanu během těhotenství, mají v séru specifické protilátky IgM, ačkoliv neexistuje žádný důkaz izotypového přesmyku před jejich vlastní vakcinací (Gill *et al.*, 1983).

Na druhou stranu ale samozřejmě platí, že novorozenci mají omezenou schopnost aktivovat imunitní odpověď jak v rovině kvalitativní, tak kvantitativní ve srovnání s dospělými jedinci. Tento nedostatek funkčnosti by mohl spočívat v defektu interakce jakýchkoliv výkonných komponent imunitního systému asociovaných s efektivní aktivací hostitelské imunity. Dle názoru Holta a Jonese (2000) byl tento rozsah defektu za některých okolností přeceněn jako vedlejší výsledek metodiky použité pro daný výzkum .

První fáze hematopoetického vývoje probíhá v mesodermu žloutkového vaku a extraembryonální mezenchymální tkáni. Ve 3. - 4. týdnu gestace lze detekovat pluripotentní erytroidní a granulomakrofágové progenitory. Migrace těchto primitivních buněk do jater a tedy jejich detekce v krevním oběhu je pozorovatelná od 4. týdne těhotenství. Játra se stávají hlavním místem hematopoézy v 5. a 6. týdnu. V 5. - 10. týdnu procházejí játra enormní změnou velikosti a tím i vzrůstá počet jaderných buněk. Prekurzory krevních buněk sice proliferují, ale pouze velice málo se diferencují, ačkoliv se objevují oddělené populace granulocytů/makrofágů. V 11. - 12. týdnu vzniká brzlík a slezina a v kostní dřeni jsou detekovatelné kmenové buňky (Migliaccio *et al.*, 1986). Ve 3. trimestru začíná jaterní hematopoéza ustávat a úplně ustává brzy po narození.

Ve 12. - 19. týdnu těhotenství při odběru krve plodu fetoskopii se v kulturách této krve nacházejí jak erytroidní, tak granulocyt/monocytové prekurzory: 42 - 68 % monocytů, 27 - 41 % neutrofilů a 5 - 30 % eosinofilů (Linch *et al.*, 1982). Ale ačkoliv je zastoupení prekurzorů granulocytů v cirkulaci poměrně vysoké v této době, tak se zralé granulocyty vůbec během fetálního vývoje nevytváří (Forestier *et al.*, 1991).

2.2.1.1 MAKROFÁGY A DENDRITICKÉ BUŇKY

Dendritické buňky, makrofágy a B buňky hrají klíčovou roli v počáteční fázi specifické imunitní odpovědi, protože slouží k pohlcení, zpracování a vystavení antigenu T buňkám. Ačkoliv jsou dendritické buňky považované za profesionální APC, o jejich vývoji během fetálního období neexistuje příliš mnoho informací. Proto jsou zařazeny do kategorie monocytů a makrofágů, které se objevují v krevní cirkulaci již v rané fázi těhotenství (Forestier *et al.*, 1991).

Ve 4. - 6- týdnu se vyskytují ve žloutkovém vaku a mezenchymu dvě populace buněk se strukturou dendritických buněk či makrofágů. Podobně vypadající buňky se vyskytují též v 5. týdnu v prehematopoetických játrech. Skupina buněk ve žloutkovém vaku nese převážně MHC II. třídy negativní fenotyp a pouze minoritně jsou zastoupeny MHC II pozitivní buňky (Janossy *et al.*, 1986). Negativní populace MHC II se objevuje hlavně v kůře brzlíku, v marginálních zónách lymfatických uzlin, v červené dřeni sleziny a v průběhu erytropoetického vývoje také v kostní dřeni. MHC II pozitivní buňky se v malém množství vyskytují v průběhu celého intrauterinního vývoje v játrech (7. - 8. týden), lymfatických uzlinách (11. - 13. týden) a v oblasti dřene brzlíku (16. týden) (Janossy *et al.*, 1986).

Výskyt MHC II pozitivních buněk se neomezuje pouze na vyjmenované oblasti, ale jsou k nalezení i v kůži a gastrointestinálním traktu. Počty Kupfferových buněk (makrofágů jaterních sinů) se pohybují od velmi nízkých na začátku těhotenství (17. týden) po srovnatelné s dospělými jedinci při narození. Langerhansovy buňky (dendritické buňky v kůži) jsou detekovatelné od 6. - 7. týdne těhotenství, během prvního trimestru migrují do epidermis a již ve druhém trimestru připomínají fenotyp buněk dospělých jedinců (Foster *et al.*, 1986).

Jediné populace monocytů/makrofágů/dendritických buněk, které byly funkčně analyzovány, jsou ty z pupečnickové krve odebrané při narození. Zde byla prokázána celkově nižší schopnost produkce cytokinů zahrnujících TNF- α a IL-12 než u dospělých (Wong *et al.*, 2005). Stejně tak i exprese kostimulačních molekul CD86 a CD40 je značně limitována a k jejímu zvýšení nevede ani stimulace aktivátory (CD40L, IFN- γ) (Han *et al.*, 2004). Tento fakt souvisí se schopností fagocytovat, která je u novorozenců nižší. Aktivita pinocytózy naopak odpovídá dospělým jedincům (Sorg *et al.*, 1999). Při porovnání morfologických znaků neonatálních mDC s mDC dospělých se ukazuje snížená schopnost diferenciací novorozeneckých buněk (Liu *et al.*, 2001), stejně jako exprese HLA-A, B, C, HLA-DR a intracelulárního adhezivního ICAM-1 a CD54, což logicky negativně ovlivňuje

chemotaxi (Hunt *et al.*, 1994). V souvislosti s adaptivní částí imunitního systému se testovala schopnost DC úspěšně prezentovat antigen T buňkám a ta se ukázala být méně efektivní, než jak je tomu u DC dospělých jedinců (Hunt *et al.*, 1994; Wong *et al.*, 2005).

2.2.1.2 T BUŇKY

Lidské lymfocyty odvozené od žloutkového váčku se v játrech objevují již několik týdnů po početí. Mezi 10. - 12. týdnem jsou k nalezení ve slezině a vykazují jistou odpovídavost na mitogenní stimulaci fytohemaglutininem a anti-CD3 (Holt and Jones, 2000; Stites and Pavia, 1979). Od 18. do 24. týdne těhotenství lze v mesenterických lymfatických uzlinách nalézt vysoké zastoupení CD45RA⁺ buněk, které jsou považovány za naivní, minoritní populace představující B buňky a monocyty. V tom samém časovém úseku se ve slezině plodu nachází stejné množství T buněk, B buněk a monocytů/makrofágů (von Hoegen *et al.*, 1995). V této fázi gravidity nejsou schopné T lymfocyty z brzlíku a lymfatických uzlin ještě odpovídat na mitogenní stimulaci fytohemaglutininem (PHA) nebo na anti-CD3 protilátku, ačkoliv aktivační znak těchto buněk CD69 zvyšuje svou expresi. Na IL-2 reagují proliferací.

Slezina je považována za imunokompetentní již v 18. týdnu těhotenství, kdy mají T buňky kolem sebe již dost kostimulačních buněk k plné aktivaci. Oproti tomu v mesenterických lymfatických uzlinách ještě není dostatek těchto podpůrných buněk nebo nejsou dostatečně funkční.

Ve 20. - 22. týdnu se objevuje schopnost tymocytů vázat antigen a dokonce byly zaznamenány i reakce specifické pro daný alergen (Jones *et al.*, 1996). Ačkoliv mnoho skupin prokázalo, že mononukleární buňky pupečnickové krve (CBMC) reagují na alergeny, je stále předmětem diskuze, zda tento jev doopravdy odráží normální odpovědi paměťových buněk, protože nebyla prokázána korelace ani s vystavením matky alergenům, ani s následným rozvojem alergie u potomka (Holt, 2008).

U novorozenců se v krvi a slezině vyskytuje velmi malé množství paměťových buněk s fenotypem CD45RO⁺, velice málo ve srovnání se stavem u dospělých jedinců, kdy tvoří cca polovinu T buněčné populace. Překvapivě jsou však tyto buňky poměrně hojně rozšířené u předčasně narozených dětí, kdy tvoří asi 25% buněk ve slezině a 10% v krvi, obsahují jak populaci CD4⁺, tak CD8⁺. Tyto buňky CD4⁺CD45RO⁺ často exprimují CD25 a jsou schopné proliferace jako odpovědi na IL-2, ale již ne na anti-CD2 nebo anti-CD3 (Byrne *et al.*, 1994). Současný názor vědců se přiklání na stranu hypotézy, že tato populace odpovídá embryonálním autoreaktivním T lymfocytům v anergním stavu.

Únik autoreaktivních T buněk do periferie před negativní selekcí se během nitroděložního vývoje vyskytuje poměrně často. $CD45RO^+$ se považuje za znak maturovaných paměťových T lymfocytů, ke změně z fenotypu $CD45RA^+$ na $CD45RO^+$ však dochází také při závěrečném kroku vývoje v brzlíku (Fujii *et al.*, 1992). Otázkou tedy stále zůstává, zda tato populace v játrech, slezině a cirkulaci plodu představuje $CD45RO^+$ populaci nezralých lymfocytů původně z brzlíku či paměťové buňky.

2.2.1.3 B BUŇKY

Již v 8. týdnu těhotenství se v játrech plodu objevují pro-B ($CD24^+$ /povrchové IgM⁻) a pre-B buňky. Ve slezině jsou detekovatelné ve 13. - 23. týdnu v peritoneu a pleurální dutině pak v 15. týdnu (Namikawa *et al.*, 1986). V této době je distribuce B buněk ve slezině difúzní, shlukovat do primárních uzlíků se začínají kolem 24. týdne, což je později než v lymfatických uzlinách.

Důležitým místem vývoje B lymfocytů jsou játra, kde pre-B buňky postupně získávají povrchový IgM (8. týden) a následovně IgD (13. týden); dále jsou pozitivní pro CD20 a negativní pro CD21 a CD22 (Bofill *et al.*, 1985).

V lymfatických uzlinách (16. - 17. týden) a slezině (16. - 21. týden) jsou B buňky s vysokou expresí IgM (Namikawa *et al.*, 1986). Primární lymfatické uzlíky se kolem folikulárních dendritických buněk vyvíjí od 17. týdne těhotenství a obsahují prakticky čistou populaci B buněk. Ve fetálních lymfatických uzlinách nejsou germinální centra B buněk pravděpodobně z nedostatku antigenu.

Hojný počet nezralých B buněk se nalézá v kostní dřeni (16. - 20. týden) a jejich počet se postupně s věkem snižuje, zatímco současně narůstá exprese maturačních znaků.

Ve 12. týdnu vstupují B buňky do periferní cirkulace a jsou pozitivní pro CD19, CD20, CD21, CD22, MHC II, IgM a IgD (Bofill *et al.*, 1985). V krvi plodu se vyskytuje vyšší procento $CD5^+$ B buněk (B1 buněk), jejich počet pak s postupujícím těhotenstvím klesá, při porodu ale stále tvoří majoritní populaci B buněk (Tucci *et al.*, 1991). $CD5^+$ B buňky jsou ve větší míře nezávislé na T lymfocytech a produkují polyreaktivní protilátky, které mohou mít roli v primární imunitní odpovědi a být velice užitečné v první linii obrany, což má u novorozenců kruciální význam.

2.2.1.4 PRODUKCE PROTILÁTEK

Prvotní produkce protilátek IgG a IgM začíná již v 10. týdnu těhotenství ve slezině, maximálních hodnot dosahuje pak kolem 17. a 18. týdne. Koncentrace IgG v séru stoupá pomalu od 6. do 22. týdne, větší nárůst je pak do 26. týdne a dramaticky se zvedá do porodu, ačkoliv většina tohoto IgG je mateřského původu (Gitlin and Biasucci, 1969), neboť v průběhu těhotenství dochází k transplacentárnímu přenosu mateřského IgG, který se zvyšuje po 20. týdnu gravidity a vrcholí po 32. týdnu (Malek *et al.*, 1996; Palfi and Selbing, 1998). Pasivně získaný IgG přetrvává v krvi novorozence asi 20 dní, postupně je katabolizován (Schelonka *et al.*, 1994). Novorozenci začínají na svůj vlastní IgG spoléhat po narození, úrovně IgG dospělých jedinců dosahují až ve 3 letech věku (Saji *et al.*, 1999). Syntéza IgE byla pozorována od 11. týdne těhotenství v játrech a plicích plodu a od 21. týdne ve slezině (Miller *et al.*, 1973).

Ačkoliv aktivní produkce protilátek plodem začíná poměrně brzo na začátku těhotenství, jejich celková sérová koncentrace je velice nízká u IgM, ještě nižší u IgA a IgE. Úrovně dospělých dosahují teprve až několik měsíců či dokonce let po narození – v případě IgA může dojít k dosažení úrovně tvorby dospělými jedinci až v období puberty (Tucci *et al.*, 1991).

Na stimulaci polyklonálními aktivátory reagují B lymfocyty pouze expresí nízkoafinního IgM. Izotypový přesmyk na IgE je teoreticky možný soudě podle vyzrálosti B buněk, ale k jeho spuštění jsou zapotřebí vyšší hladiny IL-4, než jaké stačí u dospělých jedinců (Pastorelli *et al.*, 1990). Velmi nízká produkce IgE během těhotenství tedy není vinou nekompetence B buněk, ale nedostatečnou produkcí IL-4 fetálními buňkami a tedy nezralostí Th populace.

2.2.1.4.1 PŮVOD A ROLE IgE V IMUNITNÍM SYSTÉMU PLODU

Dosud žádná studie přímo nepotvrdila reálnou možnost průchodu maternálního IgE přes bariéru placenty. Nicméně několik vědeckých skupin prokázalo maternální původ IgE v oblasti placenty (Faulk *et al.*, 1974; Joerink *et al.*, 2009). Ten by naznačoval, že IgE může přes bariéru placenty procházet. V článku Dr. Rindsjö *et al.* (2010) dokonce navrhli 4 mechanismy možného průchodu: (I) Transport IgE pomocí vazby na IgE receptor galektin-3. (II) Endocytóza IgE podobným mechanismem jako IgG a vazba na FcRn uvnitř endosomu. (III) Transport přes trofoblast v komplexu s IgG nebo s alergenem. (IV) Přenos IgE přes placentu pomocí exosomů. Exosomy jsou 30 - 100 nm membránové váčky, které mohou být uvolněny mimo buňku různými buňkami imunitního systému a také epitelu

(Admyre *et al.*, 2008). Tuto teorii podporují studie o maternálním původu IgE v pupečníkové krvi, které prokázaly korelaci koncentrací specifického IgE mezi matkou a novorozencem (Bertino *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2003).

Naopak jedna z posledních studií na vysoce specifických čipech s velkým rozlišením podporuje opačnou teorii, že IgE detekovatelné v pupečníkové krvi novorozence je fetálního původu (Kamemura *et al.*, 2012; Pfefferle *et al.*, 2008) a je tedy důsledkem *in utero* senzibilizace plodu alergeny, které přes placentu prokazatelně procházejí (Szépfalusi *et al.*, 2000). Tuto teorii podporuje schopnost B buněk produkovat specifické protilátky IgE již od 11. týdne gestace (Miller *et al.*, 1973).

Jak je tedy více než jasné, stav poznání v této oblasti je velmi nejednoznačný a předmětem mnoha diskuzí.

2.2.2 TH1 – TH2 PARADIGMA V TĚHOTENSTVÍ

V kritické periodě vývoje imunitního systému plodu velmi záleží na tom, jaké regulační molekuly jsou produkovány v jeho okolí ať matkou, placentou či plodem samotným, protože speciálně cytokiny hrají hlavní roli v nastavení imunitní odpovědi ve prospěch Th1 nebo Th2. Těhotenství je u matky spojené s přechodným snížením kapacity buněčně zprostředkované imunity (Weinberg, 1984), zvýšením produkce protilátek a tím pádem predominancí Th2 cytokinů na materno-fetálním rozhraní (Jones *et al.*, 1997; Wegmann *et al.*, 1993). Není zatím známo, zda u alergických matek dochází k většímu posunu na stranu Th2 imunitní odpovědi a zda to ovlivňuje vývoj imunitního systému plodu (Barrett, 2008).

Zvýšená přítomnost Th2 cytokinů (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) během těhotenství je pravděpodobně zapříčiněna suprimovanou buněčnou větví imunity, speciálně sníženou aktivitou NK buněk a dalšími faktory, které podporují akceptaci plodu v děloze matky (Warner *et al.*, 1997). Graviditu potlačují Th1 cytokiny (IFN- γ) (Mosmann and Coffman, 1989). Důkaz byl proveden adoptivním transferem T buněk, u kterých výrazně dominovalo Th1 nastavení buněčné odpovědi, do březí myši, jenž vyústil v kompletní resorpci plodu způsobenou pravděpodobně toxicitou IFN- γ pro placentu (Uthoff *et al.*, 2003).

Existují důkazy toho, že by se na posunu mateřské imunitní odpovědi v době těhotenství směrem k Th2 mohla účastnit i placenta produkcí různých faktorů (IL-4, IL-10 (Roth *et al.*, 1996), prostaglandin E₂ (Hilkens *et al.*, 1995), progesteron (Szekeres-Bartho and Wegmann, 1996)). Obecně řečeno většina zjištění podporuje názor, že když se ve třetím trimestru začne placenta vyvíjet, celý imunitní systém je polarizován do Th2 (Dealtry *et al.*, 2000). Placenta produkuje vysoké koncentrace velké škály mediátorů, z nichž některé

jsou Th2 trofické a/nebo Th1 supresivní, například IL-4 a IL-10 (Roth *et al.*, 1996). Th2 cytokiny jsou exprimovány placentou v prvním a třetím trimestru a v termínu porodu (Denison *et al.*, 1998). V druhém trimestru jsou přítomny pouze IL-10 a IL-13 (Hanna *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2000). Oproti tomu klíčový cytokin Th1 odpovědi IFN- γ je možné detekovat pouze v relativně nízkých koncentracích v placentě v prvních třech měsících a jeho množství se zvyšuje v době porodu (Wegmann *et al.*, 1993)

Cytokiny a ostatní proteiny produkované matkou a placentou mohou potenciálně procházet přes membránu placenty, absorpci amniotické tekutiny kůží, dýchacím a gastrointestinálním traktem (Fukamatsu *et al.*, 1984). V současné době není žádný určitý důkaz, že by se cytokinové prostředí v děloze alergické matky nějak lišilo (např. větší preferencí Th2) od matky zdravé. I když proteomické profilování našlo 14 rozdílů v placentě a 10 rozdílů v plazmě pupečnickové krve mezi astmatickými a neastmatickými matkami (Papadogiannakis, 1997). Přenos mateřských CD4⁺ Th2 lymfocytů přes placentu by mohl teoreticky posunout vývoj imunitního systému plodu směrem k upřednostňování Th2.

Preference Th2 odpovědi nezralým imunitním systémem je pravděpodobně výsledkem antigenní prezentace APC při neadekvátní kostimulaci, odlišnou funkčností T buněk po antigenní stimulaci, nižší účinnosti neonatálních APC a celkově menším počtem T buněk a APC (Siegrist, 1997).

K postupné rovnováze mezi Th1 a Th2 imunitní odpovědí dochází po narození dítěte. Th2 je upřednostňovaná během těhotenství, zatímco Th1 v období dospělosti (Holt and Jones, 2000). Děti s vysokou genetickou zátěží atopie mají sníženou schopnost produkovat Th1 specifický cytokin IFN- γ (Holt *et al.*, 1992; Holt and Macaubas, 1997). Je tedy potenciálně možné, že tento deficit spolu s defektem v produkci Th1 polarizujících mediátorů jako například IL-12 může být příčinou zhoršeného či opožděného nástupu kompetence Th1 imunitní odpovědi na vzdušné alergen. Kopp *et al.* (2001) ukázali, že senzibilizace matky alergenem vede ke snížení produkce IFN- γ jejími stimulovanými buňkami periferní krve a naopak zvýšení sekrece IL-13 buňkami pupečnickové krve potomků (Kopp *et al.*, 2001). Výsledky studií na psím a myším modelu naznačují, že arteficiální, experimentální stimulace Th1 imunitní odpovědi po narození může působit jako protiváha vlivu matky na rozvoj následné alergické senzibilizace potomka.

V poslední době byly popsány další buněčné subpopulace (regulační T buňky – Treg, Th17) podílejících se pravděpodobně na průběhu alergických onemocnění. Th17 buňky mají schopnost rekrutovat granulocyty do místa alergického zánětu při projevech astmatu,

což může zesílit celou reakci většinou ještě komplikovanou bakteriálními infekcemi. Nicméně je velmi nepravděpodobné, že Th17 buňky hrají roli v klasických IgE zprostředkovaných alergických onemocněních. IL-17 produkovaný Th17 buňkami může indukovat produkci IgM, IgG a IgA protilátek, ale ne IgE (Annunziato *et al.*, 2007) a přítomnost IL-4 působí jako inhibiční signál pro diferenciaci Th17 buněk (Chen *et al.*, 2007). Treg buňky působí proti rozvoji alergického onemocnění několika mechanismy: potlačováním funkce efektorových Th1, Th2 a Th17 buněk, eosinofilů, žírných buněk a bazofilů, dále jsou schopné indukovat izotypový přesmyk z IgE na IgG4 a suprimovat zánětlivé dendritické buňky a migraci buněk do místa infekce (Palomares *et al.*, 2010). Popisem těchto nových buněčných subpopulací dochází k narušení klasického vnímání Th1 - Th2 paradigmatu, nicméně jakékoliv jiné uspořádání ještě nebylo prokazatelně ověřeno.

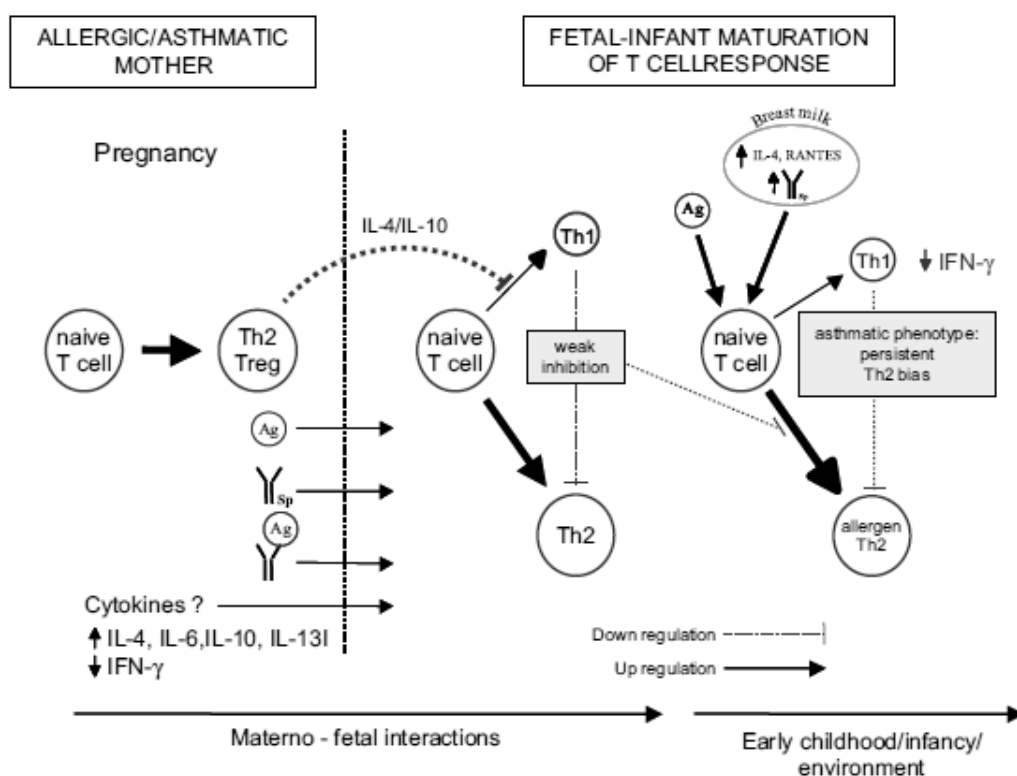
2.2.3 IN UTERO SENZIBILIZACE

Několik studií ukázalo, že mononukleární buňky pupečnickové krve proliferují po stimulaci vzdušnými alergeny (Holt *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1996; Miles *et al.*, 1996; Prescott *et al.*, 1997; Szépfalusi *et al.*, 2000). Běžnou interpretací tohoto jevu je možnost vystavení plodu v děloze alergenům, což vede k reakci s jeho T buňkami (Holt *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1996; Miles *et al.*, 1996; Prescott *et al.*, 1997; Szépfalusi *et al.*, 2000). Maturované CD4⁺ a CD8⁺ T buňky se vyskytují u lidí od 17. týdnu těhotenství, a jsou proto potenciálně schopné generovat v děloze specifickou buněčnou odpověď (Jones *et al.*, 1996). Jones *et al.* (1996) při svém výzkumu zjistili, že děti matek, které byly vystaveny pylu břízy ve 22. týdnu těhotenství a později, měly signifikantně vyšší proliferativní odpověď CBMC při stimulaci tím samým alergenem než děti matek, které nebyly po celé své těhotenství antigenu vystaveny nebo se s ním setkaly před 22. týdnem. Tato zjištění naznačují, že vzdušné alergeny mohou procházet přes placentu během kritické fáze vývoje a tím působit stimulaci a podporovat vyzrávání T buněk.

Koncept *in utero* senzibilizace ovšem není bez kontroverze. Smillie *et al.* (2001) zjistili nulovou korelaci mezi vystavením matky alergenům domácího roztoče (HDM) během těhotenství a následné proliferativní odpovědi CBMC nebo PBMC v 1 roce života. Stejně tak Chan-Yeung *et al.* (1999) ukázali, že není žádná asociace mezi tím, kdy je matka během těhotenství vystavena HDM a výskytem následného astmatického fenotypu a alergického zánětu spojivek ve 12. měsíci a roce po narození. Dle názoru dalších vědců, kteří vycházeli z odhadovaného množství alergenů, s nímž těhotná žena může denně přijít

do styku (10 - 100 ng), je toto množství nedostatečné k tomu, aby ta část absorbovaná placentou byla schopna stimulovat imunitní systém plodu (Platts-Mills *et al.*, 2000; Platts-Mills and Woodfolk, 2000).

Studie Rindsjö and Scheynius (2010) navrhuje možný mechanismus působení relativně nízké koncentrace alergenu v prostředí. Již preformované IgE maternálního původu se naváže na FcεRI (vysokoafinní IgE receptor) APC plodu, čímž dochází ke koncentraci alergenu a zlepšení jeho antigenní prezentace. Vazba alergenu na buňky placenty by také mohla vést k lokální produkci cytokinů, které by mohly ovlivnit vývoj imunitního systému plodu. Tím by mohlo docházet k senzibilizaci budoucího imunitního systému dítěte alergenem.



Obrázek 2

Potenciálně může vliv alergického mateřského prostředí (allergic/asthmatic mother) během těhotenství (pregnancy) způsobit posun rovnováhy Th1/Th2 ve prospěch Th2 imunitní odpovědi při reakci na vzdušné alergeny u dítěte (fetal-infant maturation of T cell response). Alergeny, protilátky specifické pro daný alergen a komplexy alergen-protilátka mohou procházet přes placentu a interagovat s plodem. Během těhotenství produkuje placenta převážně cytokiny (cytokines) Th2 typu (IL-4, IL-6, IL-10 a IL-13) a velmi málo Th1 cytokinů (IFN-γ). Po porodu mohou být potomci alergických matek vystaveni vyšším hladinám protilátek specifických pro daný alergen, chemokinů a cytokinů podporující Th2 imunitní odpověď v mateřském mléce. Navíc mohou mateřské lymfocyty přecházet přes placentu nebo mateřským mlékem. Vystavení alergenu brzy po porodu, kdy je vliv matky ve prospěch Th2 odpovědi silný, může vyvolat preferenci Th2 imunity při reakci na vzdušné alergeny u dítěte.

Převzato z: Barrett (2008).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 ZÍSKÁVÁNÍ MATERIÁLU A CHARAKTERISTIKA PACIENTŮ

Odběr klinického materiálu probíhal ve spolupráci s Ústavem péče o matku a dítě v Podolí po informovaném souhlasu matky. Pupečnicková krev byla uchovávána v lednici (max 6 hod) před zpracováním.

Pro účely této studie byla za alergickou matku považována matka, která trpěla alergickým onemocněním a byla v péči imunologa/alergologa nejméně dva roky. Onemocnění bylo potvrzeno vyšetřením lékaře (kožní testy a specifické IgE) a pacientka se eventuálně léčila antihistaminiky.

3.2 IZOLACE MONONUKLEÁRNÍCH LEUKOCYTŮ Z KRVĚ

Pomocí gradientové centrifugace dochází k rozdělení frakcí krve podle vznášivé hustoty na jednotlivé složky - erytrocyty a granulocyty, mononukleární leukocyty, plazmu s krevními destičkami. Následným odebráním prstýnku mononukleárních leukocytů a jejich mnohonásobným promytí lze izolované buňky použít pro nasazení buněčných kultur.

1. odběr krve: 30 ml krve do transfúzní nádoby s 0,3 ml heparinu (1000 j/ml) (Léčiva a.s.), konečná koncentrace heparinu s krví je 10 j/ml krve
2. naředit krev s heparinem 1:1 minimálním esenciálním médiem (MEM) (Sigma), nechat vytemperovat na laboratorní teplotu
3. převrstvit na Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Science AB); 15ml zkumavky, na 3 ml Ficoll-Paque (23°C) navrstvit cca 8 ml krve
4. centrifugovat: 30 min, 23 °C, 400 g
5. odstranit vrchní vrstvy plazmy i s médiem až k prstenci mononukleárních leukocytů (CBMC) sterilní Pasteurovou pipetou
6. odsát prstenec tak, aby nedošlo ke kontaminaci Ficollem (spodní vrstva): dvě zkumavky do jedné (15ml zkumavky), doplnit pod okraj chladným MEMem, promíchat Pasteurovou pipetou
7. centrifugovat: 10 min, 4 °C, 1000 g
8. promýt: slít supernatant, roztřepat, systémem 2 → 1 přenést buňky, doplnit chladným MEMem, promíchat
9. centrifugovat: 10 min, 4 °C, 500 g

10. promýt: slít supernatant, roztřepat, systémem 2 → 1 přenést buňky, doplnit chladným MEMem, promíchat
11. centrifugovat: 10 min, 4 °C, 500 g
12. přidat 5 ml MEM
13. inkubovat 1hod v termostatu při 37 °C v 5% atmosféře CO₂ (uvolnění imunoglobulinů navázaných na buňky pomocí Fc receptorů)
14. doplnit zkumavku pod okraj chladným MEMem, promíchat
15. centrifugovat: 10 min, 4 °C, 500 g
16. promýt: slít supernatant, roztřepat, doplnit MEMem pod okraj, promíchat
17. centrifugovat: 10 min, 4 °C, 500 g
18. promýt: slít supernatant, roztřepat, doplnit MEMem pod okraj, promíchat
19. centrifugovat: 10 min, 4 °C, 500 g
20. promýt: slít supernatant, roztřepat, doplnit MEMem pod okraj, promíchat
21. centrifugovat: 10 min, 4 °C, 500 g
22. příprava buněčné suspenze v RPMI na cytokiny: slít supernatant, roztřepat, přidat 5 ml média na cytokiny
23. příprava vzorků pro počítání v Bürknerově komůrce: z promíchaného vzorku odebrat 50 µl buněčné suspenze + 950 µl Türkova roztoku (NYCOM a.s., 5 x ředěný v destilované vodě), nechat stát cca 10 minut pro lýzu erytrocytů a promíchat
24. počítání buněk v Bürknerově komůrce: spočítat 2x50 čtverců, aritmetický průměr, výsledný počet buněk $\times 10^5$ = počet buněk v 1 ml výchozí suspenze
25. ředění na kultivaci: požadovaná koncentrace buněk $1,1 \times 10^6$ buněk/ml (výsledná koncentrace buněk v kultuře 10^6 /ml), stimulatory musí být 10x koncentrovanější (naředí se buňkami), ředící roztok RPMI na cytokiny – celkový objem v jedné 10ml zkumavce = 1 ml
26. kultivovat v termostatu při teplotě 37 °C v 5% atmosféře CO₂ a maximální vlhkosti po dobu 3 dnů

3.3 IMUNOENZYMATICKÝ PRŮKAZ CYTOKINŮ (ELISA)

ELISA je imunoenzymatická esej, která byla pro potřeby tohoto pokusu použita pro stanovení koncentrace cytokinů v supernatantech tří denních buněčných kultur po stimulaci rozličnými mitogeny a alergenů. Pro zvýšení specifity, citlivosti a přesnosti metody byla vybrána přímá sendvičová ELISA se sekundární protilátkou biotinylovanou. Funkčním enzymem katalyzujícím oxidaci substrátu (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin - TMB) za pomoci peroxidu byla zvolena křenuv peroxidáza.

1. navázat monoklonální protilátku anti-human IL-X v množství 75 μ l na jamku – ředit fyziologickým roztokem pufovaným fosfátem (PBS) na koncentraci dle údajů od výrobce
2. ponechat při laboratorní teplotě přes noc
3. promýt desku 3 x PBS s 0,05% Tweenem a vyklepnout
4.
 - a. 150 μ l na jamku blokovacího roztoku
 - b. při stanovení TGF- β 300 μ l blokovacího roztoku
5. nechat 1 hod při laboratorní teplotě
6.
 - a. vzorky zamražených supernatantů buněčných kultur na IL-6 a TNF- α ředit ředícím roztokem TBS 10 x, na ostatní cytokiny bez ředění
 - b. při stanovení TGF- β je třeba vzorky oživit: 100 μ l vzorku + 20 μ l 1N HCl – protřepat a 10 min nechat stát – přidat 20 μ l 1,2N NaOH + 0,5M HEPES – protřepat
7. napipetovat vzorky do destičky 50 μ l na jamku v dubletu
8. standardy (různá ředění rekombinantních cytokinů) nanést podle daných koncentrací v dubletu 50 μ l na jamku
9. inkubovat 2 hod při laboratorní teplotě
10. do lednice přes noc
11. promýt desku 3 x PBS s 0,05% TWEENem a vyklepnout
12. 50 μ l na jamku protilátky s biotinem - ředit TBS na koncentraci dle údajů od výrobce v PBS
13. inkubovat 2 hod při laboratorní teplotě
14. promýt desku 3 x PBS s 0,05% TWEENem a vyklepnout

15. streptavidin značený křenovou peroxidázou (Immunotech) ředit 1000 x v TBS – 50 µl na jamku
16. inkubovat 20 min při laboratorní teplotě
17. promýt desku 3 x PBS s 0,05% TWEENem a vyklepnout
18. 50 µl substrátu na jamku: 3 ml TMB + 3 ml citrátového pufru + 1 µl H₂O₂ (30% Chemické závody Sokolov, a.s.) na jednu desku
19. dát do temna, enzymatická reakce probíhá rychle
20. zastavit: 50 µl na jamku 2M H₂SO₄ (PENTA, LACHEMA)
21. změřit optickou hustotu (OD) při 450 nm
22. odečít koncentrace cytokinů pomocí kalibrační křivky (software: KIM Immunothemical Processing)

3.4 IZOLACE RNA Z KULTUR POMOCÍ KITU “RNASY MINI KIT” (QIAGEN)

Tato metoda byla použita pro izolování celkové RNA z buněčných kultur po 24 hodinách inkubace při 37 °C a atmosféře 5% CO₂. V konečném kroku je kontrolována čistota a koncentrace získané RNA.

1. jednodenní kultury stočit 10 min, 20 °C, 450 g
2. odebrat supernatant
3. přidat 350 µl RLT a promíchat na vortexu
4. přidat 350 µl ethanolu (70 %) (Lékárna VFN) a promíchat, aby se homogenizovaly obě fáze
5. přenést do kolonek RNase mini spin column na izolaci RNA
6. centrifugovat 15 sec, 23 °C, 17 000 g
7. slít supernatant ze spodní části kolonky
8. přidat 350 µl roztoku RW1
9. centrifugovat 15 sec, 23 °C, 17 000 g
10. naředit roztok DNázy – na jednu kolonku: 80µl DNázy (RNase-Free DNase set (50) Applied Biosystems)... 10 µl enzymu + 70 µl pufru RDD/ vzorek) a aktivovat DNázu překlápěním
11. slít supernatant
12. přidat 80 µl enzymu na kolonku a nechat působit 15 min
13. přidat 350 µl RW1

14. centrifugovat 15 sec, 23 °C, 17 000 g
15. slít supernatant
16. přidat 500 µl RPE
17. nechat 2 min stát
18. centrifugovat 15 sec, 23 °C, 17 000 g
19. slít supernatant
20. přidat 500 µl RPE
21. nechat 2 min stát
22. centrifugovat 15 sec, 23 °C, 17 000 g
23. slít supernatant
24. centrifugovat 1 min, 23 °C, 17 000 g
25. vyměnit spodní části kolonek za mikrozkušavky
26. přidat 40 µl H₂O prosté RNáz (RNase-Free H₂O) na kolonku
27. centrifugovat 1 min, 23 °C, 17 000 g
28. eluovaná RNA se nyní nachází v mikrozkušavce
29. koncentraci a čistotu RNA změříme na NanoDropu
30. případnou kontaminaci DNA vyloučit elektroforézou na 2% agarosovém gelu a zároveň zkontrolovat integrita vyizolované RNA (dle ribozomálních podjednotek 18S a 28S)

3.5 MĚŘENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY RNA

Koncentrace RNA byla určena spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm s použitím NanoDropu 2000. Absorbance 1,0 při vlnové délce 260 nm odpovídá 40 µg RNA v 1 ml.

Poměr mezi hodnotami absorbance při 260 nm a 280 nm (A_{260}/A_{280}) umožňuje určit čistotu RNA s ohledem na proteiny. Poměr absorbance při 260 nm a 230 nm hodnotí míru kontaminace organickými sloučeninami (fenoly). Jako použitelná pro další postup byla kvalifikována RNA s poměry: $260/280 \geq 1,7$; $260/230 \geq 1,6$.

3.6 ELEKTROFORÉZA

Elektroforéza byla použita k vyloučení kontaminace izolované RNA genomickou DNA a ověření přítomnosti RNA (viz Obrázek 3). Dále byla elektroforézu využita na kontrolu přítomnosti pouze jediného produktu po polymerázovou řetězovou reakci (PCR) (viz Obrázek 4). Na 2% agarosový gel (Type II: Medium EEO) s ethidium bromidem: 600 mg agarosy (Sigma) + 30 ml pufru TAE (Promega) + 10 µl ethidium bromidu (Sigma) se

naneslo 10 μ l vzorku s přidanými 3 μ l bromfenolové modři. Bromfenolová modř byla připravena smícháním bromfenolové modři (Sigma), glycerolu (Sigma) a destilované vody v poměru 2:1:2. Směs byla separována 15 min při 120 V. Vizualizace gelu byla provedena transluminátorem, gel byl vyfotografován a zpracován v počítačovém programu GeneSnap.



Obrázek 3. Ověření čistoty izolované RNA a vyloučení kontaminace DNA.



Obrázek 4. Průkaz vzniku pouze jednoho produktu při PCR reakci.

3.7 REVERZNÍ TRANSKRIPCE

Metoda kdy se z izolované RNA pomocí reverzní transkripce získala cDNA. Tedy komplementární DNA již bez intronů připravená na následnou specifickou PCR. Pro potřeby tohoto projektu byla vybrána obecná reverzní transkripce. Na přepis RNA na cDNA byl použit komerční kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (na 1000 reakcí) (Applied Biosystems). Reagencie v poskytnutém poměru byly napipetovány do 0,2ml mikrozkušavek (viz Tabulka 1) a přidáno stejné množství RNA (vyrovnaných koncentrací):

High-Capacity cDNA Reverse Transcription	
roztok RT	2 μ l
dNTP mix (100mM)	0,8 μ l
směs náhodných primerů	2 μ l
reverzní transkriptáza	1 μ l
inhibitor RNáz	1 μ l
voda bez nukleáz	3,2 μ l
celkem na reakci	10 μ l

Tabulka 1 Poměr složek reakce reverzní transkripce pro 20 μ l celkové reakce.

Termální režim reverzní transkripce:

10 min 25 °C

30 min 48 °C

10 min 95 °C

minimálně 5 min při 4 °C

3.8 KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR (qRT-PCR)

qRT-PCR byla měřena genová exprese vybraných cytokinů hrajících roli při rozvoji alergie u dětí zdravých a alergických matek. CBMC dětí alergických a nealergických matek byly stimulovány nespecifickými polyklonálními aktivátory (PHA) a specificky alergeny (OVA, BOJ, BRI, ROZ). Amplifikace DNA polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) spočívá v opakované replikaci úseku DNA ohraničeného specifickými primery pomocí termostabilní DNA polymerázy (Taq polymerázy izolované z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*) procesem teplotního cyklování. Real-time PCR je založena na sledování průběhu PCR přímo během reakce pomocí fluorescenčních sond (TaqMan sondy značené na 5' konci fluorescenčním barvivem). Přístroj měří hladinu fluorescence, která vzrůstá se stoupajícím množstvím amplifikované cDNA během každého cyklu PCR. Hodnota Ct představuje počet cyklů potřebných pro překonání prahu fluorescence. Tedy čím větší hodnota Ct, tím nižší počet kopií cDNA (mRNA) daného genu. Pro vyjádření relativní kvantity genové exprese je použit vztah $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Analýza primárních dat byla provedena v programu 7300 System Software a relativní kvantita genová exprese byla vyhodnocena pomocí programu GenEx. Exprese cílových genů jsou normalizovány genem se stálou expresí v buňkách (endogenní kontrolou - β -aktinem) a porovnány vůči nestimulované kontrole.

Celkový objem reakční směsi je 25 μ l a obsahuje:

6,25 μ l vody bez nukleáz (Applied Biosystems)

12,5 μ l TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)

1,25 μ l specifické sondy (sonda a primery pro + a - vlákno templátu) - TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems)

5 μ l cDNA

Termální režim PCR reakce:

2 min 50 °C

10 minut 95 °C

40 cyklů: denaturace při 95 °C 15 sec

elongace při 60 °C 60 sec

3.9 INTRACELULÁRNÍ BARVENÍ BUNĚK CELÉ KRVE A JEJICH DETEKCE POMOCÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

Pro stanovení intracelulárních cytokinů byla použita průtoková cytometrie, neboť nám umožňuje detekci proteinů v lumen buněk pomocí fluorescenčně značených protilátek. Pupečnicková krev byla stimulována jak polyklonálními aktivátory tak alergeny. Při *in vitro* stimulaci je nutné zablokovat exocytózu, aby se zabránilo kontinuální sekreci daného cytokinu. Jednotlivé buněčné subpopulace jsou charakterizovány použitím protilátek proti typickým povrchovým znakům těchto buněk. Barvení protilátkami proti jednotlivým cytokinům umožní stanovit procento buněk krevní suspenze tvořících daný cytokin. Detekce fluorescenčně značených protilátek navázaných na epitopy cílových molekul pomocí průtokového cytometru je založena na principu excitačních a emisních spekter jednotlivých cytochromů.

1. do 10 ml zkumavek napipetovat 0,5 ml RPMI + 10 µl stimulátoru (PHA, OVA, BOJ, BRI, ROZ c = 1 mg/ml) + 1 µl GolgiPlugTM Protein Transport Inhibitor (BD Biosciences) + 0,5 ml nestimulované krve s heparinem (c = 10 j/ml) a promíchat na vortexu
2. inkubovat 4 hod v termostatu při teplotě 37 °C v 5% atmosféře CO₂
3. do zkumavek na FACS napipetovat 5 µl povrchové protilátky pouze CD4 (pro IL-10, IL-13, TGF-β, IL-17) nebo CD4 + CD8 (pro IFN-γ), promíchat na vortexu
4. ponechat 20 - 30 min ve tmě při laboratorní teplotě
5. přidat 2 ml lyzačního roztoku (10 x ředěný) (Lysing Solution (BD)), promíchat na vortexu
6. ponechat 10 min ve tmě při laboratorní teplotě
7. centrifugovat 5 min, 4 °C, 500 g, slít supernatant
8. promýt 2 ml PBS, promíchat na vortexu
9. centrifugovat 5 min, 4 °C, 500 g, slít supernatant

10. přidat 0,5 ml permeabilizačního roztoku (Cytofix/Cytoperm (BD)), promíchat na vortexu
11. ponechat 20 - 30 min ve tmě při laboratorní teplotě
12. přidat 2 ml PBS
13. centrifugovat 5 min, 4 °C, 500 g, slít supernatant
14. přidat 2 ml fixačního roztoku (10 x ředěný) (Perm/Wash (BD)), promíchat na vortexu
15. ponechat 10 min ve tmě při laboratorní teplotě
16. centrifugovat 5 min, 4 °C, 500 g, slít supernatant
17. promýt 2 ml PBS, promíchat na vortexu
18. centrifugovat 5 min, 4 °C, 500 g, slít supernatant
19. přidat 5 µl protilátky na intracelulární barvení (10 µl u IL-10), promíchat na vortexu
20. ponechat 20 - 30 min ve tmě při laboratorní teplotě
21. promýt 2 ml PBS, promíchat na vortexu
22. centrifugovat 5 min, 4 °C, 500 g, slít supernatant
23. bez prodlení změřit na průtokovém cytometru

3.10 ROZTOKY

1. TBS = ředící roztok na ELISU: 20 mM Trizma (Tris[hydroxymethyl]-aminomethan) (Sigma) + 150 mM NaCl (LACHEMA) v H₂O; pH upraveno na 7,3 pomocí HCl (PENTA)+ 0,1 % BSA (Sigma) + 0,05 % Tweenu (Sigma)
2. Blokovací roztok na ELISU: 5 % sacharosy (LACHEMA)+ 1 % BSA (Sigma) v PBS
3. Fosfátem pufrovaný fyziologický roztok PBS = roztok FF: 9 g NaCl (LACHEMA) + 1,2 g Na₂HPO₄·12H₂O (LACHEMA) + 0,2 g Na₂HPO₄· 2H₂O (LACHEMA) – doplnit destilovanou vodou do 1000 ml, pH = 7,2 – 7,4
4. RPMI 1640 na buněčné kultury: RPMI 1640 (Sigma) + 2 mM HEPES + 2 mM glutamin (SEVAC) + gentamycin (40 mg/ml) (Lek Pharmaceutical and Chemical Company d.d.)+ 25 µM β-merkaptioethanol (Sigma) + 5 % FTS (Gibco)
5. TMB na 500 ml: 200 mg TMB (3, 3-,5, 5-tetramethylbenzidin) (Sigma) + 135 ml DMF (dimethylformamid) (PENTA) – doplnit na 500 ml destilovanou H₂O
6. citrátový pufr: 0,1M citronan sodný (LACHEMA) v destilované H₂O – upravit pH na 4,2 nasyceným roztokem kyseliny citrónové (LACHEMA)
7. RLT na izolaci RNA z buněčných kultur = β-merkaptioethanol (1:100) (Sigma) + RLT

3.11 PŘÍSTROJE

ELISA- absorbance reader: SUNRISE-BASIC TECAN, Tecan Austria GmbH, Rakousko
Promývačka na mikrotitrační destičky: MRW (AM 60), DYNEX Technologies, Inc., USA
Magnetická míchačka: ARE, VELP Scientifica, Itálie
pH metr: pH/mV/Temp Meter PL-600, EZDO, Taiwan
Vortex: Vortex-Genie 2, Scientific Industrie, Inc., USA
Box s laminárním prouděním: EM BOX 180, MK SERVIS s.r.o., Česká republika
Box pro molekulární biologii: MSC 1.2, Thermo Electron LED GmbH, Německo
Box s laminárním prouděním: HOTTE MSC.12 STD GAZ, Jouan, Francie
Termostat s regulací CO₂: MCO-15AC, SANYO ELECTRIC Co., Ltd. Japonsko
Přístroj na elektroforézu: MINI-SUB CELL GT, BIO-RAD, USA
Zdroj napětí pro elektroforézu: Power Pac 200, BIO-RAD, USA
Transiluminátor: Trigon-plus, Česká republika
Centrifugy:
 Universal 30 RF, Hettich, Německo
 Mikro 22R, Hettich, Německo
 Universal 320R, Hettich, Německo
Cycler: Petier Thermal Cycler - 200, MJ RESEARCH, Inc., USA
7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems, Singapur
Průtokový cytometr: BD FACS CantoTM II Flow Cytometer, BD Biosciences, USA
Nanodrop: NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo SCIENTIFIC, USA
Analytické váhy: METTLER TOLEDO, Švýcarsko

3.12 SOFTWARE

Vyhodnocení hodnot koncentrací při ELISE - KIM Immunothetical Processing
Detekce výsledků průtokové cytometrie – FlowJo (TreeStar)
Vyhodnocení PCR - 7300 System Software
Analýza gelu elektroforézy - GeneSnap
Zaznamenání výsledků izolace RNA - Nanodrop 2000
Analýza dat - GenEx 5.4.0
Statistické hodnocení - SAS 4.0
Grafické hodnocení dat - GraphPad Prism

3.13 STATISTICKÉ METODY

Data byla hodnocena parametrickými (t-test) a neparametrickými (Mann-Whitney test) testy v závislosti na tom, zda získaná data splňovala požadavek na normální rozložení (Shapiro-Wilcoxon test). Jelikož se hodnotilo více parametrů, byla použita Bonferroniho korekce mnohočetného porovnávání, aby se zabránilo falešné pozitivě dat.

3.14 KOMERČNÍ KITY

Kit na izolaci RNA z buněčných kultur - RNasy Mini Kit (250) (Qiagen)

Kit pro reverzní transkripci: High Capacity RNA-to-cDNA Kit (50 x 20 µl reactions) (Applied Biosystems)

3.15 STIMULÁTORY

Koncentrace v kultuře pro stimulaci 10 µg/ml:

Fytohemagglutinin A (Sigma) (Phytohemagglutinin)

Ovalbumin (Sigma)

Lipopolysacharid (Sigma)

Alergeny byly laskavě poskytnuty firmou ALK-Abelló A/S.

Bojínek luční (*Phleum pratense*)

Bříza bělokorá (*Betula Linné*)

Prachový roztoč (*Dermatophagoides pteronyssinus*)

3.16 SKLO A PLASTY

Vysokoadsorpční mikrotitrační destičky s plochým dnem - F96 Maxisorp (Nunc™)

Pasteurovy pipety (Wipak Medical)

Zkumavky polystyrenové 15 ml (GAMA GROUP a.s.)

Bürknerova komůrka (P-LAB)

Injekční stříkačky 10 ml (B/Braun)

Injekční stříkačky 2 ml (B/Braun)

96-jamkové destičky na PCR - 96 Well Reaction Plates (Applied Biosystems)

Víčka na destičky - Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems)

Mikrozkumavky - Optical Tubes (Applied Biosystems)

Víčka na mikrozkumavky - Optical Caps (Applied Biosystems)

Zkumavky na FACS - FALCON 5 ml (12 x 75 mm) (BD Pharmingen™ Biosciences)

3.17 PROTILÁTKY

3.17.1 ELISA

Primární (monoklonální navazovací) protilátky ELISA (R&D system)

Sekundární (biotinylované detekční) protilátky ELISA (R&D system)

Rekombinantní cytokiny ELISA (R&D system)

3.17.2 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

PE-conjugated rat anti-human IL-10, clone: JES3-19F1 (BD PharmigenTM Biosciences)

PE-conjugated mouse anti-human IL-17A, clone: SCPI 1362 (BD PharmigenTM Biosciences)

PE-conjugated mouse anti-human IL-13, clone: JES10-5A2 (BD PharmigenTM Biosciences)

PerCP/Cy5.5 anti-human TGF- β 1 LAP, clone: BG/hLAP (BioLegend)

PE-CyTM7-conjugated mouse anti-human IFN- γ , clone: B27 (BD PharmigenTM Biosciences)

PerCP-conjugated mouse anti-human CD8, clone: SK1 (BioLegend)

APC mouse anti-human CD8 , clone MEM-31 (EXBIO)

PE-Cy7 mouse anti-human CD8, clone: SK1 (BioLegend)

APC mouse anti-human CD4, clone: MEM-241 (EXBIO)

FITC mouse anti-human CD4, clone: OKT4 (BioLegend)

4 VÝSLEDKY

4.1 STANOVENÍ EXPRESE GENŮ PRO VYBRANÉ CYTOKINY V KULTURÁCH CBMC DĚTÍ ALERGICKÝCH A NEALERGICKÝCH MATEK PO STIMULACI *IN VITRO*. qRT-PCR

Pomocí qRT-PCR byl sledován vliv různých stimulátorů na buňky pupečnickové krve dětí zdravých a alergických matek. Pozorované rozdíly v genové expresi cytokinů by mohly poukazovat na jistý prognostický znak patrný již při narození. mRNA byla izolována z buněčných kultur stimulovaných jak specifickými tak polyklonálními aktivátory.

Bílé sloupce - děti zdravých matek

Černé sloupce - děti alergických matek

ZK - nestimulovaná kontrola, kultivace pouze CBMC zdravé skupiny

AK - nestimulovaná kontrola, kultivace pouze CBMC alergická skupina

ZOVA - kultivace CBMC zdravé skupiny se stimulátorem ovalbuminem

AOVA - kultivace CBMC alergické skupiny se stimulátorem ovalbuminem

ZPHA - kultivace CBMC zdravé skupiny se stimulátorem fytohemaglutininem

APHA - kultivace CBMC alergické skupiny se stimulátorem fytohemaglutininem

ZBOJ - kultivace CBMC zdravé skupiny se stimulátorem *Phleum pratense*

ABOJ - kultivace CBMC alergické skupiny se stimulátorem *Phleum pratense*

ZBRI - kultivace CBMC zdravé skupiny se stimulátorem *Betula Linné*

ABRI - kultivace CBMC alergické skupiny se stimulátorem *Betula Linné*

ZROZ - kultivace CBMC zdravé skupiny se stimulátorem *Dermatophagoides pteronyssinus*

AROZ - kultivace CBMC alergické skupiny se stimulátorem *Dermatophagoides pteronyssinus*

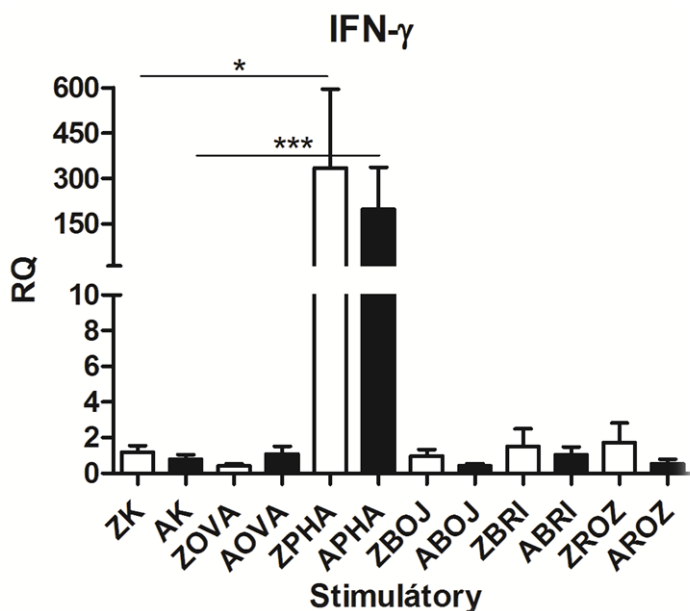
* $p < 0,0083$

** $p < 0,0017$

*** $p < 0,00017$

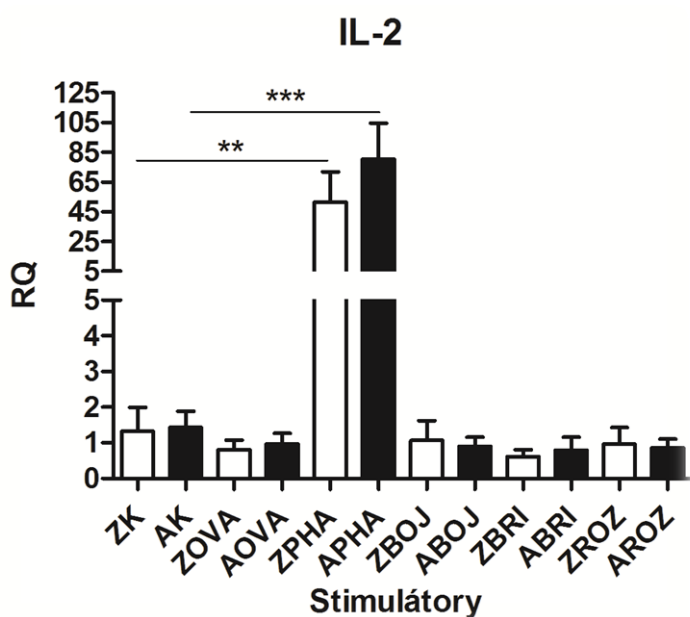
Po stimulaci polyklonálním stimulem T buněk (PHA) dochází k signifikantnímu zvýšení exprese IFN- γ jak u dětí zdravých ($p = 0,0053$), tak alergických ($p < 0,001$) matek ve srovnání s nestimulovanou kontrolou. Vyšší hladina genové exprese IFN- γ byla zjištěna po stimulaci PHA u zdravé skupiny, nicméně rozdíl ZPHA - APHA není statisticky významný. Při stimulaci alergeny nedochází k signifikantní změně exprese IFN- γ (viz Graf 1).

Graf 1. Stanovení genové exprese IFN- γ metodou qRT-PCR v jednodenních kulturách CBMC stimulovaných polyklonálními nebo specifickými stimulemi. Sloupce zobrazují průměry hodnot relativní kvantifikace u kultur CBMC dětí 9 zdravých a 11 alergických matek s vyjádřenou střední chybou průměru. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny přímkou a hvězdičky označují míru signifikance vyjádřenou na základě hodnot p .



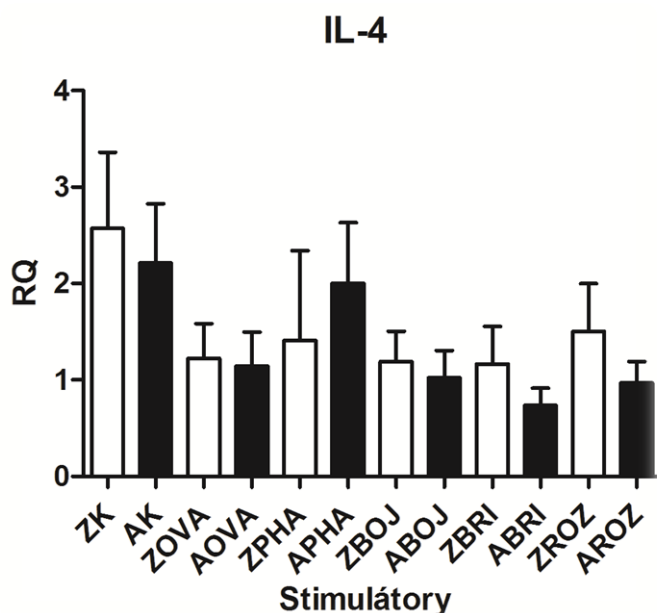
Byla naměřena signifikantně zvýšená genová exprese IL-2 u CBMC stimulovaných PHA ve srovnání nestimulovanými CBMC dětí jak zdravých ($p = 0,001$) tak alergických matek ($p < 0,001$) (viz Graf 2).

Graf 2. Stanovení genové exprese IL-2 metodou qRT-PCR v jednodenních kulturách CBMC stimulovaných polyklonálními nebo specifickými stimulátory. Sloupce zobrazují průměry hodnot relativní kvantifikace u kultur CBMC dětí 9 zdravých a 11 alergických matek s vyjádřenou střední chybou průměru. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny přímkou a hvězdičky označují míru signifikance vyjádřenou na základě hodnot p .



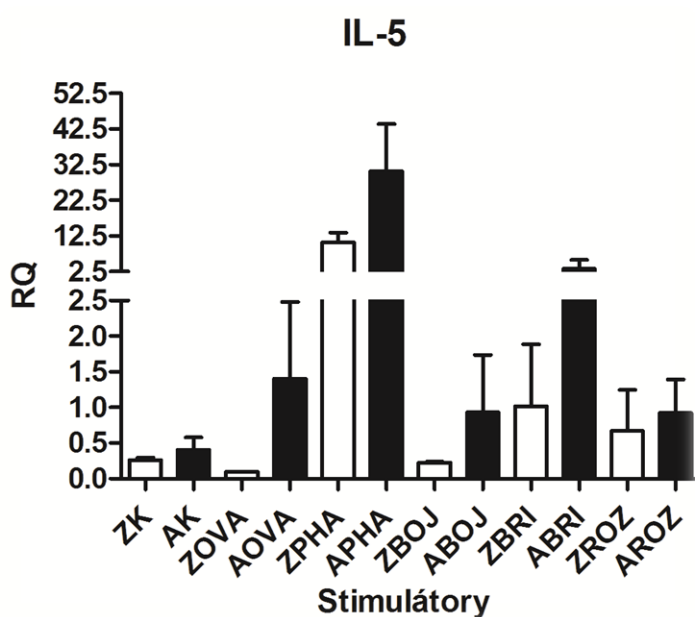
Při stanovení exprese IL-4 nejsou patrné žádné statisticky významné rozdíly. Celkové hodnoty relativní kvantifikace jsou poměrně nízké (viz Graf 3).

Graf 3. Stanovení genové exprese IL-4 metodou qRT-PCR v jednodenních kulturách CBMC stimulovaných polyklonálními nebo specifickými stimulanty. Sloupce zobrazují průměry hodnot relativní kvantifikace u kultur CBMC dětí 9 zdravých a 11 alergických matek (pod hladinou detekčního limitu 1 vzorek zdravé a 4 alergické skupiny) s vyjádřenou střední chybou průměru. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny přímkou a hvězdičky označují míru signifikance vyjádřenou na základě hodnot p.



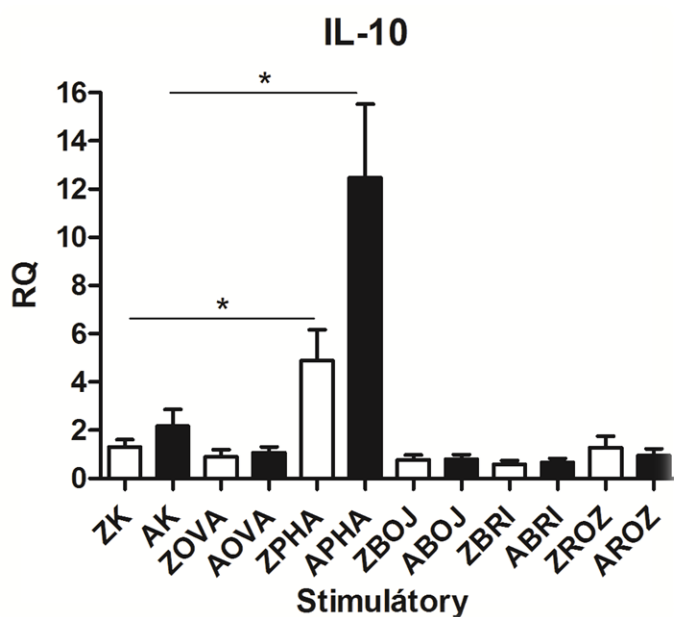
U exprese IL-5 dochází ke zvýšení po stimulaci polyklonálním stimulem T lymfocytů PHA, které je vyšší u alergické skupiny, nicméně není statisticky významné z důvodu nižšího počtu vzorků. Celkově i u alergenů je zvýšení exprese výraznější u alergické skupiny (viz Graf 4).

Graf 4. Stanovení genové exprese IL-5 metodou qRT-PCR v jednodenních kulturách CBMC stimulovaných polyklonálními nebo specifickými stimulemi. Sloupce zobrazují průměry hodnot relativní kvantifikace u kultur CBMC dětí 9 zdravých a 11 alergických matek (pod hladinou detekčního limitu 7 vzorků zdravé a 7 alergické skupiny) s vyjádřenou střední chybou průměru. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny přímkou a hvězdičky označují míru signifikance vyjádřenou na základě hodnot p.



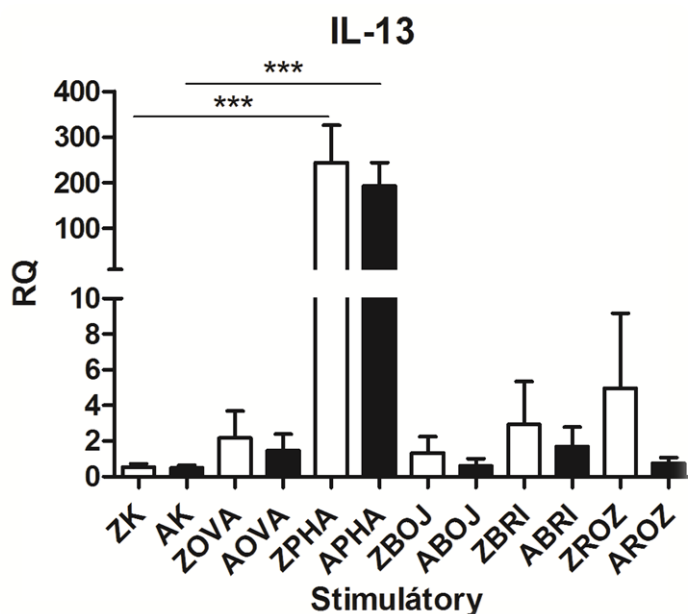
V grafu vyjadřujícím expresi IL-10 (viz Graf 5) je vidět pozitivní vliv polyklonálního stimulatoru T buněk PHA na zvýšení tvorby mRNA pro IL-10. U obou skupin dochází k signifikantnímu zvýšení exprese, u zdravé skupiny je evidentně elevace nižší ($p = 0,0072$), u alergické vyšší ($p = 0,0035$).

Graf 5. Stanovení genové exprese IL-10 metodou qRT-PCR v jednodenních kulturách CBMC stimulovaných polyklonálními nebo specifickými stimulátory. Sloupce zobrazují průměry hodnot relativní kvantifikace u kultur CBMC dětí 9 zdravých a 11 alergických matek s vyjádřenou střední chybou průměru. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny přímkou a hvězdičky označují míru signifikance vyjádřenou na základě hodnot p .



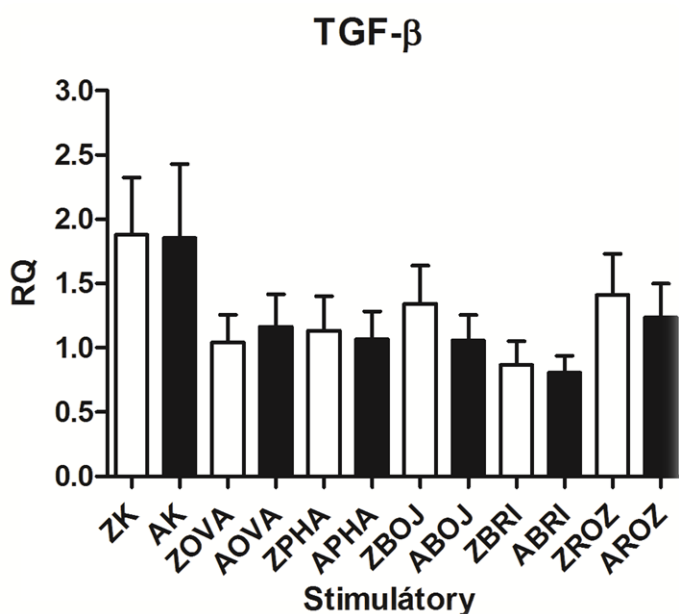
Expres IL-13 se zvyšuje po stimulaci polyklonálním stimulem T lymfocytů fytohemaglutinem jak u zdravé ($p < 0,001$), tak u alergické skupiny ($p < 0,001$). Stimulátory v podobě alergenů nemají na expresi IL-13 statisticky významný vliv a ani při porovnání mezi alergickou a zdravou skupinou zde není průkazná signifikance (viz Graf 6).

Graf 6. Stanovení genové exprese IL-13 metodou qRT-PCR v jednodenních kulturách CBMC stimulovaných polyklonálními nebo specifickými stimulemi. Sloupce zobrazují průměry hodnot relativní kvantifikace u kultur CBMC dětí 9 zdravých a 11 alergických matek s vyjádřenou střední chybou průměru. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny přímkou a hvězdičky označují míru signifikance vyjádřenou na základě hodnot p .



Relativní kvantifikace exprese TGF- β nevykazuje žádné signifikantně významné změny ani při stimulaci polyklonálním stimulátorem (PHA), ani při stimulaci alergeny (OVA, BOJ, BRI, ROZ) (viz Graf 7).

Graf 7. Stanovení genové exprese TGF- β metodou qRT-PCR v jednodenních kulturách CBMC stimulovaných polyklonálními nebo specifickými stimulátory. Sloupce zobrazují průměry hodnot relativní kvantifikace u kultur CBMC dětí 9 zdravých a 11 alergických matek s vyjádřenou střední chybou průměru. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny přímkou a hvězdičky označují míru signifikance vyjádřenou na základě hodnot p.



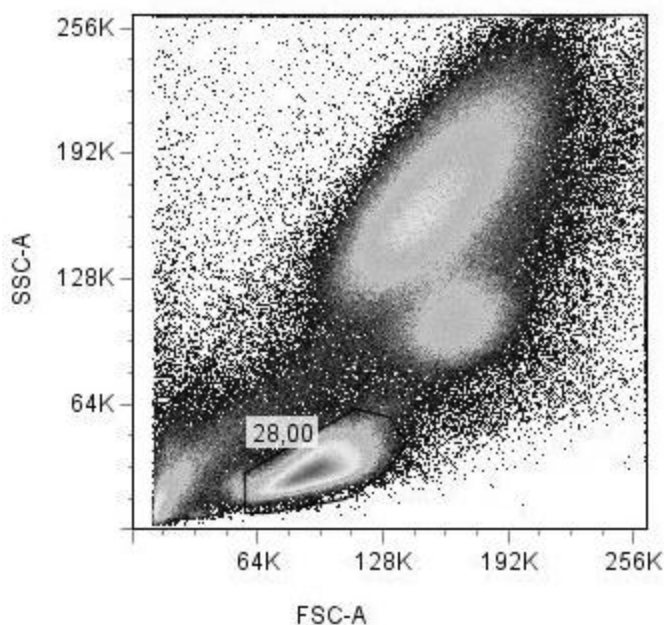
4.2 DETEKCE PRODUKCE CYTOKINŮ BUŇKAMI PUPEČNÍKOVÉ KRVE DĚTÍ ALERGICKÝCH A NEALERGICKÝCH MATEK PO STIMULACI *IN VITRO*. PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE S INTRACELULÁRNÍM BARVENÍM

Charakterizace tvorby cytokinů přímo v jednotlivých buněčných subpopulacích značených intracelulárním barvením metodou průtokové cytometrie. Blokáci exocytózy dochází k hromadění vznikajících cytokinů ve váčcích uvnitř buňky. Analyzují se tedy cytokiny, které by byly reálně produkovány buňkou, ale které nejsou exocytované do krevního séra.

4.2.1 ANALÝZA VYHODNOCOVÁNÍ INTRACELULÁRNÍCH CYTOKINŮ

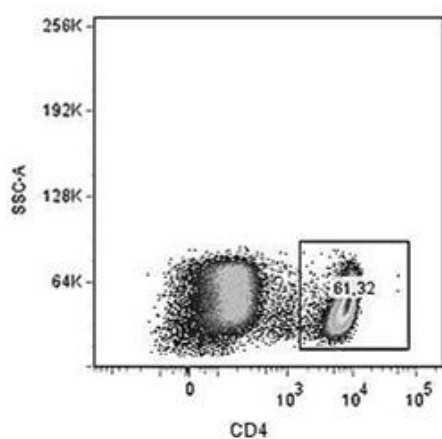
Detekce intracelulárních cytokinů průtokovou cytometrií vyžaduje výběr lymfocytární populace podle velikosti a komplexity (granularity) buněk (viz Graf 8).

Graf 8. Výběr lymfocytární populace podle velikosti (FSC - A) a komplexity či granularity (SSC - A) buněk

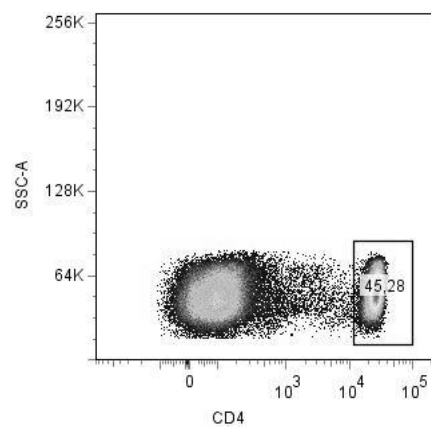


Selekce CD4 pozitivní lymfocytární subpopulace podle druhu cytochromu FITC (viz Graf 9) a APC (viz Graf 10). Při detekci IL-10, IFN- γ (v CD4⁺ subpopulaci T lymfocytů) a IL-17 bylo použito povrchové barvení FITC a při detekci IFN- γ (v CD8⁺ subpopulaci T lymfocytů), IL-13 a TGF- β povrchové barvení APC.

Graf 9. Výběr CD4 pozitivní lymfocytární subpopulace (FITC)



Graf 10. Výběr CD4 pozitivní lymfocytární subpopulace (APC)



4.2.2 DETEKCE JEDNOTLIVÝCH CYTOKINŮ V CD4⁺ SUBPOPULACI T LYMFOCYTŮ

Bílé sloupce - děti zdravých matek

Černé sloupce - děti alergických matek

ZK - nestimulovaná kontrola, kultivace pouze CBMC zdravé skupiny

AK - nestimulovaná kontrola, kultivace pouze CBMC alergická skupina

ZOVA - kultivace CBMC zdravé skupiny se stimulátorem ovalbuminem

AOVA - kultivace CBMC alergické skupiny se stimulátorem ovalbuminem

ZPHA - kultivace CBMC zdravé skupiny se stimulátorem fytohemaglutininem

APHA - kultivace CBMC alergické skupiny se stimulátorem fytohemaglutininem

ZBOJ - kultivace CBMC zdravé skupiny se stimulátorem *Phleum pratense*

ABOJ - kultivace CBMC alergické skupiny se stimulátorem *Phleum pratense*

ZBRI - kultivace CBMC zdravé skupiny se stimulátorem *Betula Linné*

ABRI - kultivace CBMC alergické skupiny se stimulátorem *Betula Linné*

ZROZ - kultivace CBMC zdravé skupiny se stimulátorem *Dermatophagoides pteronyssinus*

AROZ - kultivace CBMC alergické skupiny se stimulátorem *Dermatophagoides pteronyssinus*

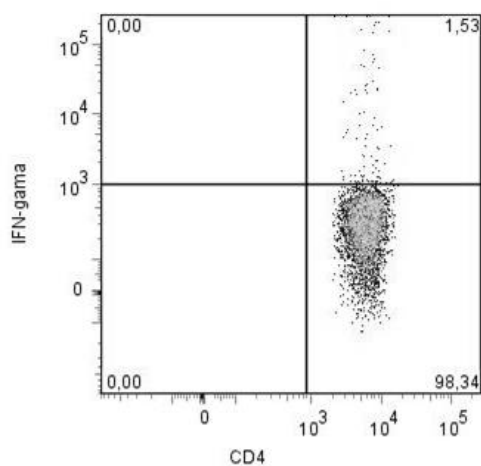
* $p < 0,01$

** $p < 0,002$

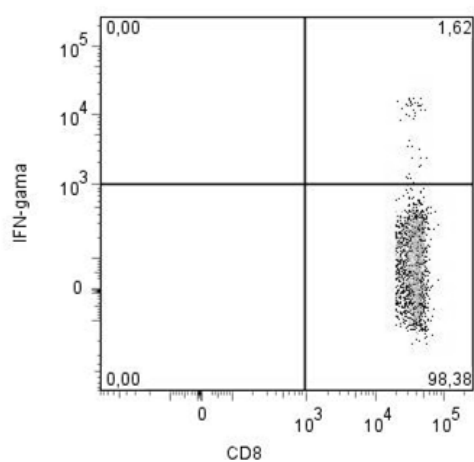
*** $p < 0,0002$

Ukázka analýzy výsledků průtokové cytometrie při selekci $CD4^+ IFN-\gamma^+$ a $CD8^+ IFN-\gamma^+$ buněčné subpopulace. V pravém horním kvadrantu představuje 1,53 % $CD4$ pozitivních buněk (viz Graf 11) a 1,62 % $CD8$ pozitivních buněk (viz Graf 12).

Graf 11. Vymezení buněčné subpopulace $CD4^+ IFN-\gamma^+$

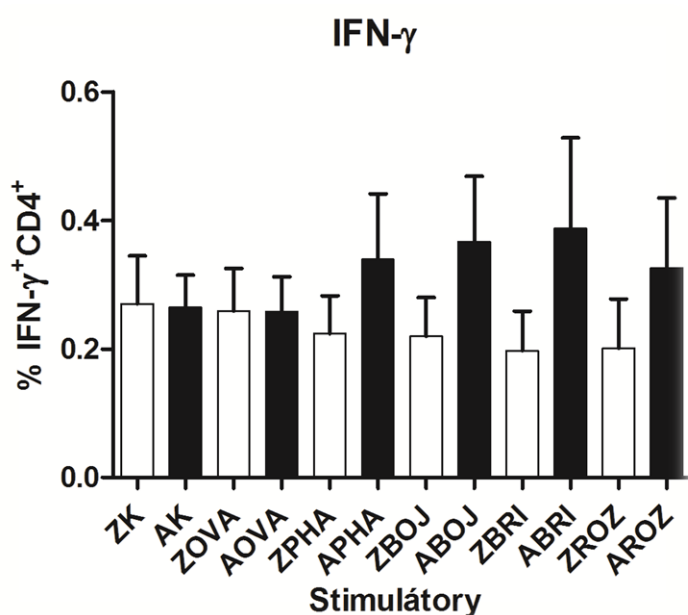


Graf 10. Vymezení buněčné subpopulace $CD8^+ IFN-\gamma^+$

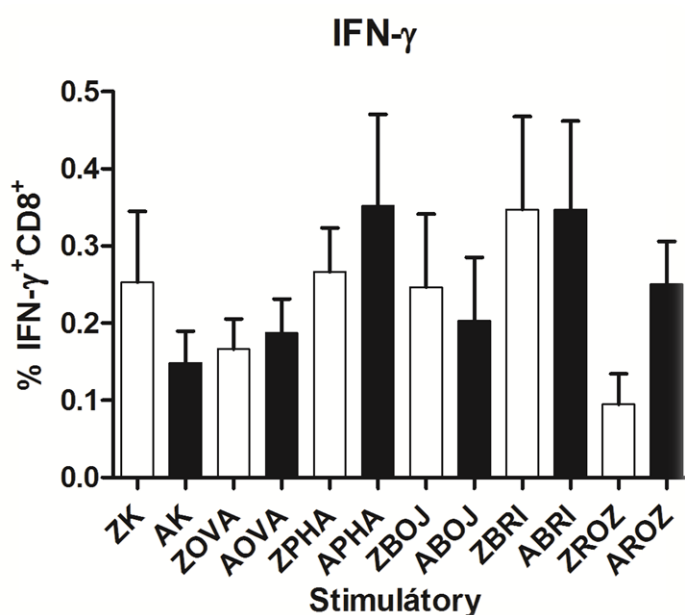


Při sledování zastoupení IFN- γ v CD4 (viz Graf 13) pozitivní populaci i v CD8 (viz Graf 14) pozitivní populaci se neprojevil žádný signifikantní rozdíl mezi zdravou a alergickou skupinou. Vizually ale dochází k mírnému zvýšení IFN- γ po stimulaci alergeny u alergické skupiny.

Graf 12. Detekce procentuálního zastoupení IFN- γ tvořících buněk v CD4⁺ populaci T lymfocytů pupečnickové krve dětí zdravých a alergických matek průtokovou cytometrií metodou intracelulárního barvení. Sloupce zobrazují průměry procentuálního zastoupení buněk pozitivních pro daný cytokin v CD4⁺ populaci u buněk pupečnickové krve dětí 28 zdravých a 22 alergických matek s vyjádřenou střední chybou průměru. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny přímkou a hvězdičky označují míru signifikance vyjádřenou na základě hodnot p.

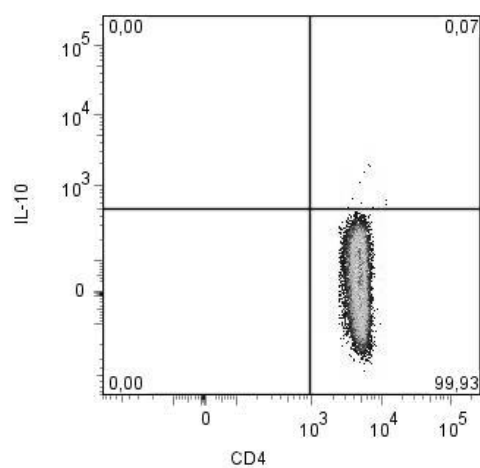


Graf 13. Detekce procentuálního zastoupení IFN- γ tvořících buněk v CD8⁺ populaci T lymfocytů pupečnickové krve dětí zdravých a alergických matek průtokovou cytometrií metodou intracelulárního barvení. Sloupce zobrazují průměry procentuálního zastoupení buněk pozitivních pro daný cytokin v CD4⁺ populaci u buněk pupečnickové krve dětí 28 zdravých a 22 alergických matek s vyjádřenou střední chybou průměru. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny přímkou a hvězdičky označují míru signifikance vyjádřenou na základě hodnot p.



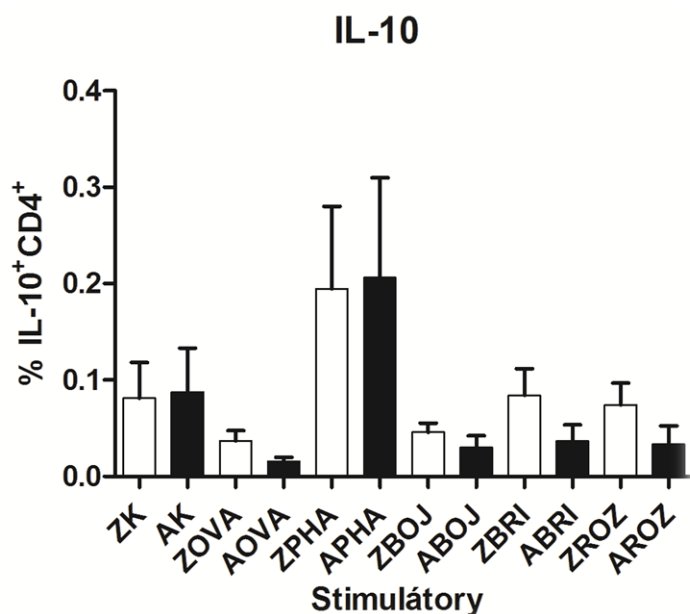
Ukázka analýzy výsledků průtokové cytometrie při selekci $CD4^{+}$ $IL-10^{+}$ buněčné subpopulace. V pravém horním kvadrantu představuje 0,07 % $CD4$ pozitivních buněk (viz Graf 15).

Graf 14. Vymezení buněčné subpopulace $CD4^{+}$ $IL-10^{+}$



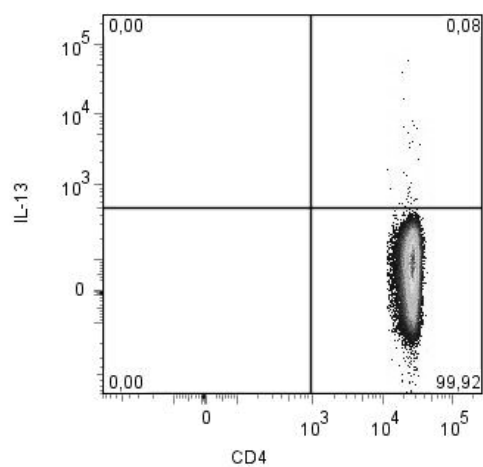
Procentuální zastoupení IL-10 tvořících buněk se zvyšuje pouze po stimulaci polyklonálním stimulem T buněk fytohemaglutininem, ačkoliv tato změna není signifikantní (viz Graf 16).

Graf 15. Detekce procentuálního zastoupení IL-10 tvořících buněk v CD4⁺ populaci T lymfocytů pupečnickové krve dětí zdravých a alergických matek průtokovou cytometrií metodou intracelulárního barvení. Sloupce zobrazují průměry procentuálního zastoupení buněk pozitivních pro daný cytokin v CD4⁺ populaci u buněk pupečnickové krve dětí 28 zdravých a 25 alergických matek s vyjádřenou střední chybou průměru. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny přímkou a hvězdičky označují míru signifikance vyjádřenou na základě hodnot p.



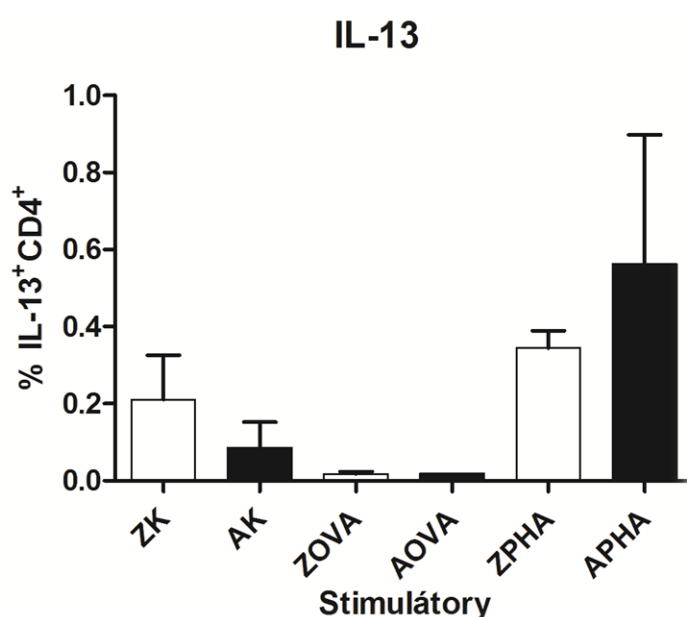
Ukázka analýzy výsledků průtokové cytometrie při selekci CD4⁺ IL-13⁺ buněčné subpopulace. V pravém horním kvadrantu představuje 0,08 % CD4 pozitivních buněk (viz Graf 17).

Graf 16. Vymezení buněčné subpopulace CD4⁺ IL-13⁺



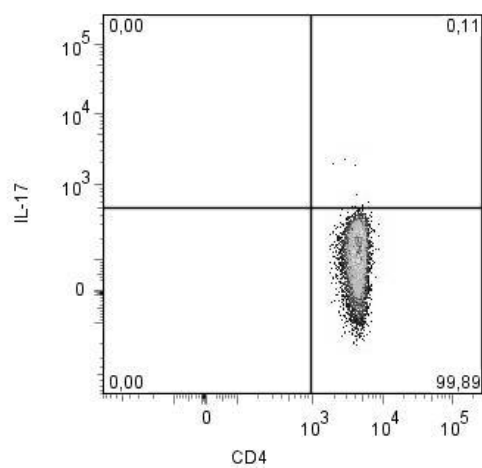
Při stimulaci pupečníkové krve alergenem (OVA) pro následné měření intracelulárního IL-13 bylo procentuální zastoupení nižší než u nestimulovaných kontrol jak u alergické, tak u zdravé skupiny, a proto nebyl proveden experiment s ostatními alergeny (BOJ, BRI, ROZ). Po stimulaci polyklonálním mitogenem T buněk (PHA) došlo ke zvýšení zastoupení buněk pozitivních pro IL-13 jak u alergické tak zdravé skupiny (viz Graf 18).

Graf 17. Detekce procentuálního zastoupení IL-13 tvořících buněk v $CD4^+$ populaci T lymfocytů pupečníkové krve dětí zdravých a alergických matek průtokovou cytometrií metodou intracelulárního barvení. Sloupce zobrazují průměry procentuálního zastoupení buněk pozitivních pro daný cytokin v $CD4^+$ populaci u buněk pupečníkové krve dětí 5 zdravých a 5 alergických matek s vyjádřenou střední chybou průměru. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny přímkou a hvězdičky označují míru signifikance vyjádřenou na základě hodnot p.



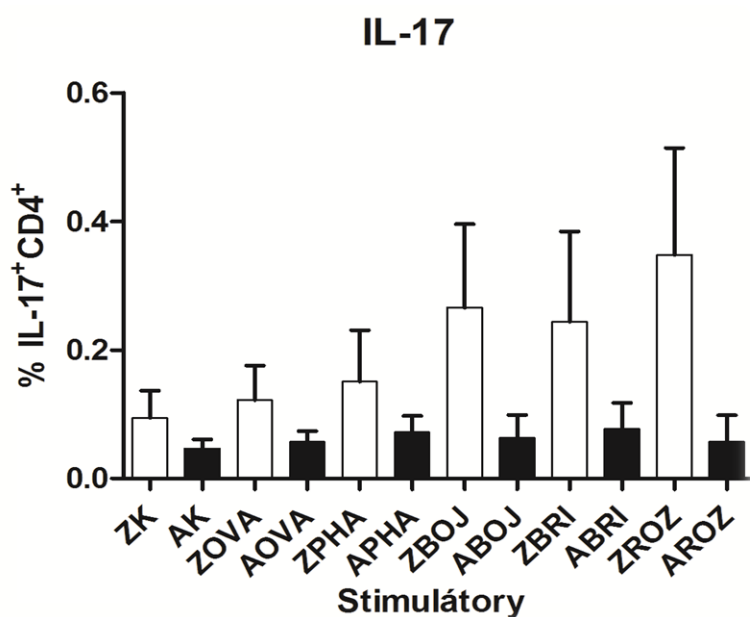
Ukázka analýzy výsledků průtokové cytometrie při selekci CD4⁺ IL-17⁺ buněčné subpopulace. V pravém horním kvadrantu představuje 0,11 % CD4 pozitivních buněk (viz Graf 19).

Graf 18. Vymezení buněčné subpopulace CD4⁺ IL-17⁺



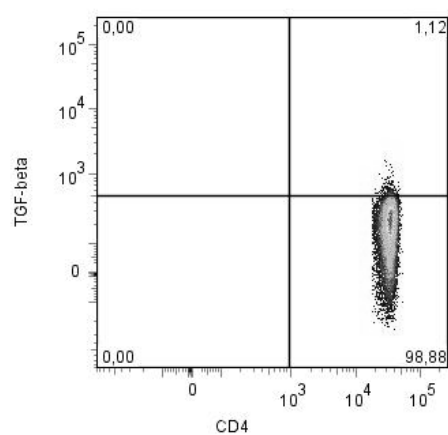
U procentuálního zastoupení IL-17 pozitivních buněk v $CD4^+$ populaci T lymfocytů dochází k jeho zvýšení po kultivaci se stimulanty více u zdravé skupiny. Změna není statisticky signifikantní. (viz Graf 20).

Graf 19. Detekce procentuálního zastoupení IL-17 tvořících buněk v $CD4^+$ populaci T lymfocytů pupečnickové krve dětí zdravých a alergických matek průtokovou cytometrií metodou intracelulárního barvení. Sloupce zobrazují průměry procentuálního zastoupení buněk pozitivních pro daný cytokin v $CD4^+$ populaci z 13 zdravých a 10 alergických jedinců s vyjádřenou střední chybou průměru. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny přímkou a hvězdičky označují míru signifikance vyjádřenou na základě hodnot p.



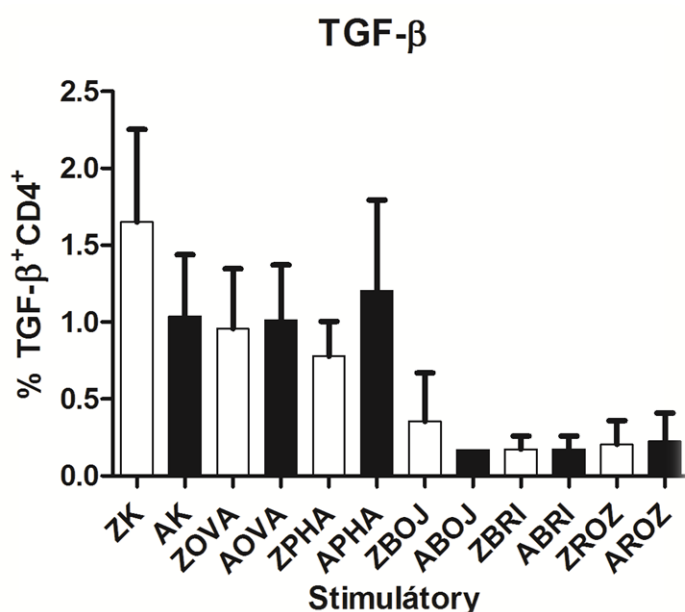
Ukázka analýzy výsledků průtokové cytometrie při selekci CD4⁺ TGF-β⁺ buněčné subpopulace. V pravém horním kvadrantu představuje 1,12 % CD4 pozitivních buněk (viz Graf 21).

Graf 20. Vymezení buněčné subpopulace CD4⁺ TGF-β⁺



Při měření procentuálního zastoupení TGF- β pozitivních buněk je tento cytokin při stimulaci alergeny (BOJ, BRI, ROZ) téměř nedetekovatelný. Ostatní stimulanty (OVA, PHA) mají procentuální zastoupení shodné u obou skupin s kontrolami (viz Graf 12).

Graf 21. Detekce procentuálního zastoupení TGF- β tvořících buněk v CD4⁺ populaci T lymfocytů pupečníkové krve dětí zdravých a alergických matek průtokovou cytometrií metodou intracelulárního barvení. Sloupce zobrazují průměry procentuálního zastoupení buněk pozitivních pro daný cytokin v CD4⁺ populaci z 8 zdravých a 13 alergických jedinců s vyjádřenou střední chybou průměru. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny přímkou a hvězdičky označují míru signifikance vyjádřenou na základě hodnot p.



4.3 MĚŘENÍ KONCENTRACE CYTOKINŮ V SUPERNATANTECH KULTUR CBMC DĚTÍ ALERGICKÝCH A ZDRAVÝCH MATEK PO STIMULACI IN VITRO. IMUNOENZYMATICKÁ METODA ELISA

Dalším způsobem, jímž se dá charakterizovat produkce cytokinů, je stanovení koncentrace v supernatantu kultur. Tato metoda umožňuje průkaz skutečného množství přítomného hotového proteinového produktu - cytokinu - produkovaného izolovanými mononukleárními leukocyty. Dokresluje tedy mozaiku postupného sledování vzniku a tvorby cytokinů buňkami pupečnickové krve.

Bílé sloupce - děti zdravých matek

Černé sloupce - děti alergických matek

ZK - nestimulovaná kontrola, kultivace pouze CBMC zdravé skupiny

AK - nestimulovaná kontrola, kultivace pouze CBMC alergická skupina

ZOVA - kultivace CBMC zdravé skupiny se stimulátorem ovalbuminem

AOVA - kultivace CBMC alergické skupiny se stimulátorem ovalbuminem

ZPHA - kultivace CBMC zdravé skupiny se stimulátorem fytohemaglutininem

APHA - kultivace CBMC alergické skupiny se stimulátorem fytohemaglutininem

ZBOJ - kultivace CBMC zdravé skupiny se stimulátorem *Phleum pratense*

ABOJ - kultivace CBMC alergické skupiny se stimulátorem *Phleum pratense*

ZBRI - kultivace CBMC zdravé skupiny se stimulátorem *Betula Linné*

ABRI - kultivace CBMC alergické skupiny se stimulátorem *Betula Linné*

ZROZ - kultivace CBMC zdravé skupiny se stimulátorem *Dermatophagoides pteronyssinus*

AROZ - kultivace CBMC alergické skupiny se stimulátorem *Dermatophagoides pteronyssinus*

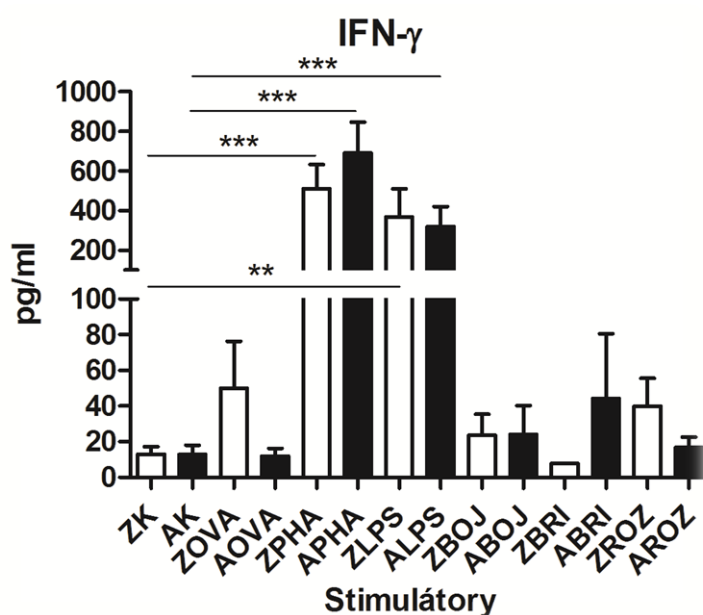
* $p < 0,0083$

** $p < 0,0017$

*** $p < 0,00017$

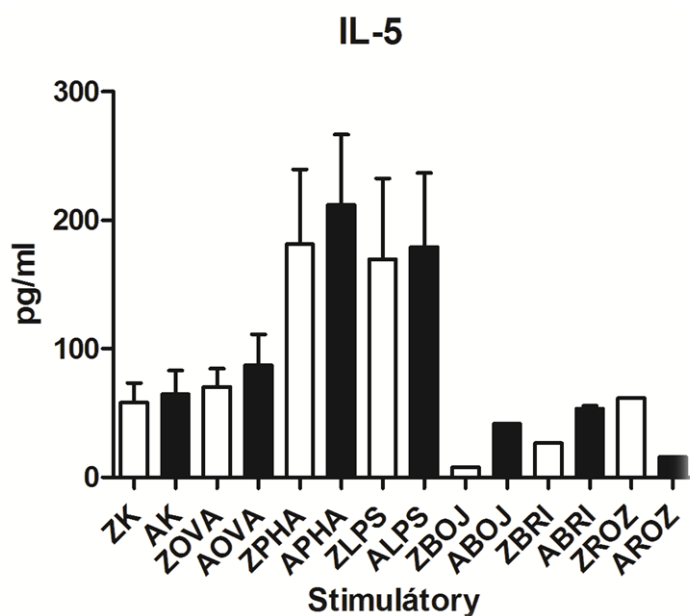
K signifikantnímu zvýšení koncentrace IFN- γ dochází po stimulaci polyklonálními stimulatory T buněk (PHA) a B buněk (LPS) u zdravé ($p = 0,0001$ a $p = 0,0009$) i alergické skupiny ($p < 0,001$ a $p < 0,001$). Alergeny (ZOVA, ABRI, ZROZ) také zvyšují koncentraci IFN- γ , ale rozdíly ve srovnání s kontrolou nejsou signifikantně významné (viz Graf 23).

Graf 22. Koncentrace IFN- γ v supernatantu kultur CBMC dětí zdravých a alergických matek stanovená metodou ELISA. Sloupce zobrazují průměry hodnot koncentrací cytokinu v supernatantu kultur CBMC dětí 23 zdravých a 22 alergických matek s vyjádřenou střední chybou průměru. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny přímkou a hvězdičky označují míru signifikance vyjádřenou na základě hodnot p .



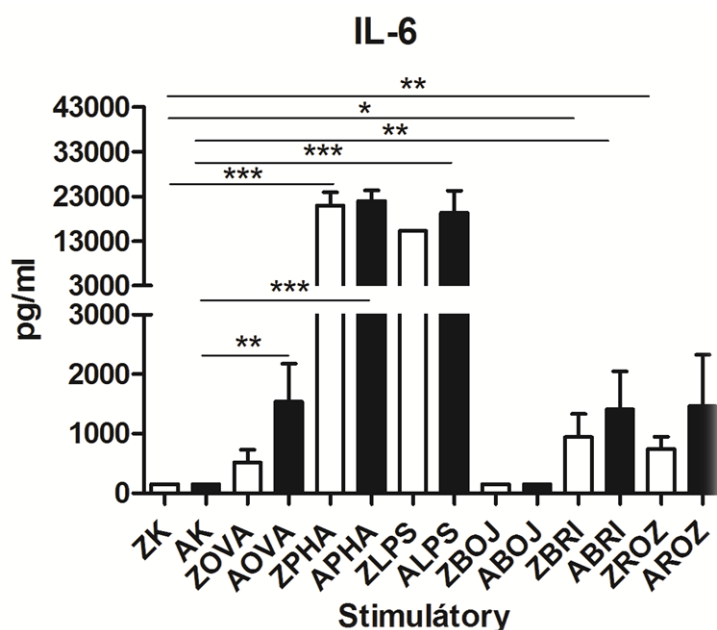
Při sledování koncentrace IL-5 dochází ke zvýšení množství cytokinu po stimulaci polyklonálními mitogeny T lymfocytů (PHA) a B lymfocytů (LPS). Rozdíly nicméně nejsou statisticky významné i z důvodu nízkého počtu naměřených vzorků (viz Graf 24).

Graf 23. Koncentrace IL-5 v supernatantu kultur CBMC dětí zdravých a alergických matek stanovená metodou ELISA. Sloupce zobrazují průměry hodnot koncentrací cytokinu v supernatantu kultur CBMC dětí 7 zdravých a 11 alergických matek s vyjádřenou střední chybou průměru. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny přímkou a hvězdičky označují míru signifikance vyjádřenou na základě hodnot p.



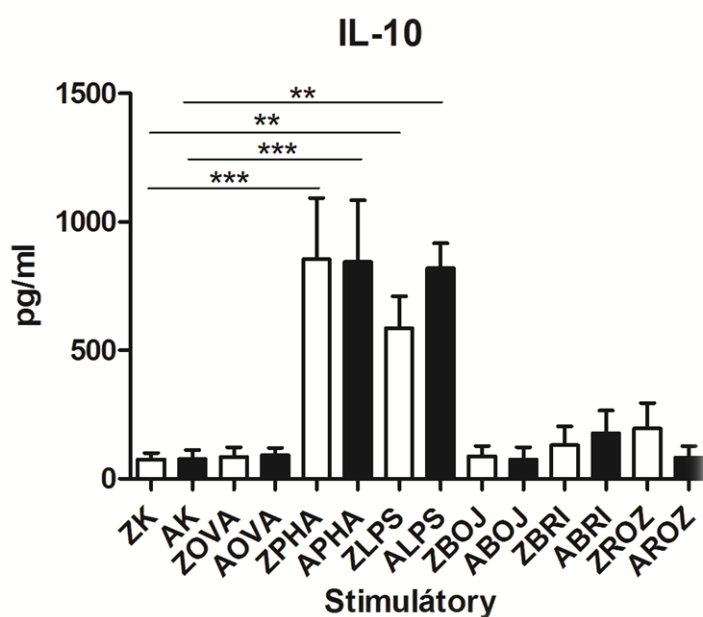
Koncentrace IL-6 v supernatantu kultur je vyšší ve srovnání s ostatními cytokiny. I proto jsou zde patrnější rozdíly po stimulaci různými antigeny. Signifikance je průkazná u zdravé skupiny mezi kontrolou a PHA ($p < 0,001$), BRI ($p = 0,0025$), ROZ ($p = 0,0008$); u alergické skupiny mezi kontrolou a OVA ($p = 0,0006$), PHA ($p < 0,001$), LPS ($p < 0,001$), BRI ($p = 0,0003$). Obecně vzato je po stimulaci vyšší koncentrace v supernatantu kultur buněk alergické skupiny, nicméně rozdíly mezi zdravou a alergickou skupinou nejsou ani v jednom případě statisticky významné (viz Graf 25).

Graf 24 Koncentrace IL-6 v supernatantu kultur CBMC dětí zdravých a alergických matek stanovená metodou ELISA. Sloupce zobrazují průměry hodnot koncentrací cytokinu v supernatantu kultur CBMC dětí 12 zdravých a 13 alergických matek s vyjádřenou střední chybou průměru. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny přímkou a hvězdičky označují míru signifikance vyjádřenou na základě hodnot p .



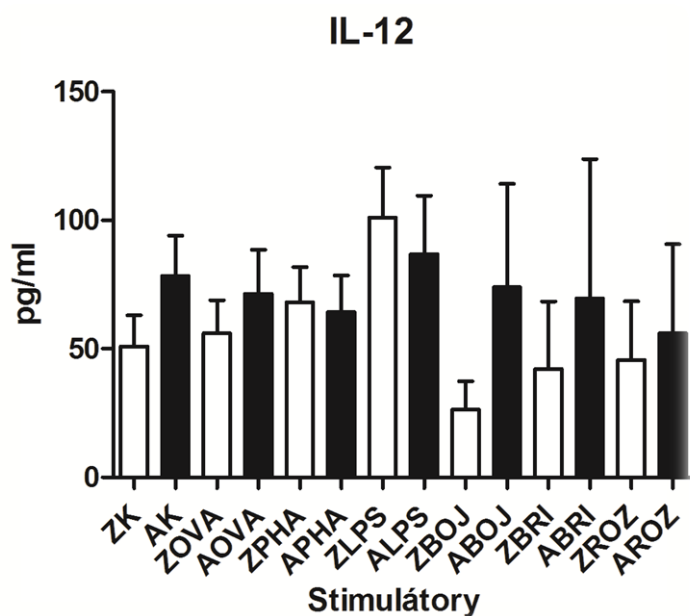
Koncentrace IL-10 v supernatantu kultur se statisticky významně zvyšuje po stimulaci polyklonálními mitogeny. Signifikantní rozdíly jsou tedy pozorovatelné u zdravé skupiny při stimulaci PHA ($p < 0,001$) a LPS ($p = 0,0003$); u alergické skupiny při stejných mitogenech: PHA ($p < 0,001$), LPS ($p = 0,0016$). Alergeny statisticky významnou změnu nezpůsobují (viz Graf 26).

Graf 25 Koncentrace IL-10 v supernatantu kultur CBMC dětí zdravých a alergických matek stanovená metodou ELISA. Sloupce zobrazují průměry hodnot koncentrací cytokinu v supernatantu kultur CBMC dětí 17 zdravých a 13 alergických matek s vyjádřenou střední chybou průměru. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny přímkou a hvězdičky označují míru signifikance.



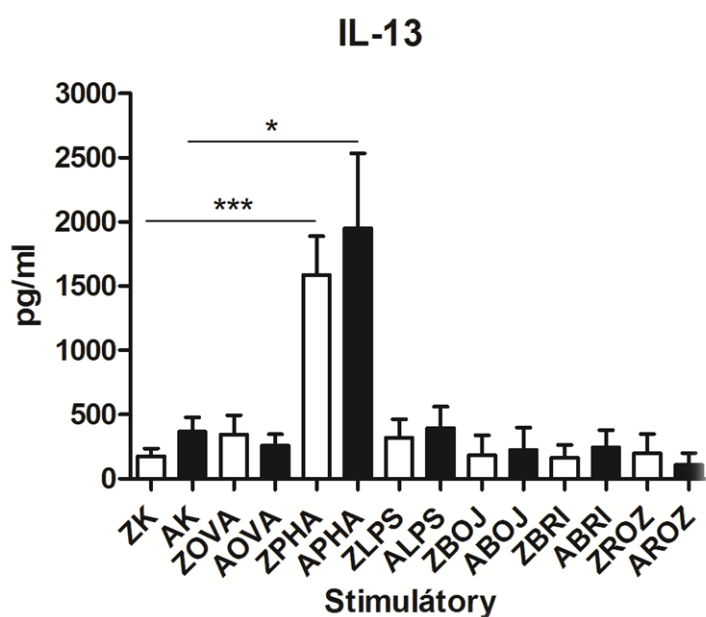
Pozorované rozdíly u koncentrace IL-12 v supernatantech kultur nejsou statisticky významné. Poněkud vyšší koncentrace je u obou skupin po stimulaci polyklonálním mitogem B buněk LPS a u alergické skupiny po reakci s alergeny (BOJ, BRI, ROZ) (viz Graf 27).

Graf 26 Koncentrace IL-12 v supernatantu kultur CBMC dětí zdravých a alergických matek stanovená metodou ELISA. Sloupce zobrazují průměry hodnot koncentrací cytokinu v supernatantu kultur CBMC dětí 21 zdravých a 18 alergických matek s vyjádřenou střední chybou průměru. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny přímkou a hvězdičky označují míru signifikance vyjádřenou na základě hodnot p.



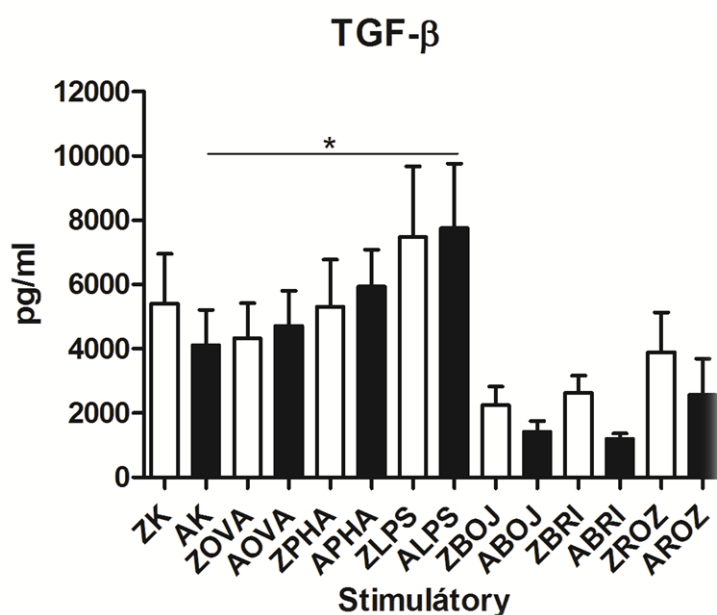
Při stanovení IL-13 v supernatantech kultur došlo k statisticky významnému zvýšení pouze po stimulaci polyklonálním stimulem T buněk fytohemaglutininem (PHA). Signifikance je tedy u rozdílu zdravá kontrola - ZPHA ($p < 0,001$) a alergická kontrola - APHA ($p = 0,0019$) (viz Graf 28).

Graf 27 Koncentrace IL-13 v supernatantu kultur CBMC dětí zdravých a alergických matek stanovená metodou ELISA. Sloupce zobrazují průměry hodnot koncentrací cytokinu v supernatantu kultur CBMC dětí 24 zdravých a 24 alergických matek s vyjádřenou střední chybou průměru. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny přímkou a hvězdičky označují míru signifikance vyjádřenou na základě hodnot p .



Koncentrace TGF- β je celkově poměrně vysoká v supernatantech kultur u obou skupin. Po stimulaci alergeny (BOJ, BRI, ROZ) dochází k jejímu snížení pod hladinu kontrol. Stimulací ovalbuminem, fytohemaglutininem a lipopolysacharidem pozvolna roste u zdravé i alergické skupiny, signifikantní zvýšení je mezi kontrolou a LPS u alergické skupiny ($p = 0,0058$) (viz Graf 29)

Graf 28 Koncentrace TGF- β v supernatantu kultur CBMC dětí zdravých a alergických matek stanovená metodou ELISA. Sloupce zobrazují průměry hodnot koncentrací cytokinu v supernatantu kultur CBMC dětí 23 zdravých a 24 alergických matek s vyjádřenou střední chybou průměru. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny přímkou a hvězdičky označují míru signifikance vyjádřenou na základě hodnot p .



5 DISKUZE

Cílem této práce bylo porovnání reaktivity mononukleárních buněk pupečnickové krve (CBMC) dětí zdravých a alergických matek ve snaze posoudit případné funkční rozdíly mezi buňkami pupečnickové krve dětí s vysokým a nízkým rizikem budoucího vzniku alergického onemocnění. Jako odraz reaktivity buněk byla sledována tvorba cytokinů na třech úrovních a to jednak na genové (qRT-PCR), jednak na proteinové úrovni. V tomto druhém případě byly prokazovány jak cytokiny uvnitř T buněk (FACS), tak cytokiny tvořené CBMC a uvolňované do prostředí (ELISA). Byly analyzovány buňky stimulované buď polyklonálně, sledující celkovou reaktivitu buněk, nebo specificky nejčastějšími alergeny, což by mohlo odrážet předchozí intrauterinní stimulaci plodu alergeny. Dalším cílem bylo porovnat mnohdy rozporuplné poznatky z ostatních podobných studií, které nejsou jednotné ani z hlediska výsledků, ani metodiky. Proto byla sledována rozsáhlá paleta cytokinů - IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, TGF- β , které byly zvoleny na základě svého významu pro proalergické a protialergické ladění organismu.

U dětí alergických matek je prokazatelně vyšší riziko pozdějšího vzniku alergie (Litonjua *et al.*, 1998), ale ne u všech dětí alergických matek se vyvine alergické onemocnění. Naopak, i u dětí nealergických matek se může alergie rozvinout, i když s nižší pravděpodobností než u dětí alergických matek (Sandford *et al.*, 1996). Imunitní funkce u dětí, které následně vyvinou alergii a u těch, které zůstanou zdravé, se liší v několika ohledech (Björkstén, 1999). Alergická onemocnění jsou obecně charakterizována preferenční Th2 imunitní odpovědí s vysokou produkcí IL-4, IL-5, IL-9 a IL-13 (Imada *et al.*, 1995; Jenmalm *et al.*, 2001; Till *et al.*, 1997b) a srovnatelnou (Till *et al.*, 1997a) nebo nižší (Imada *et al.*, 1995) tvorbou IFN- γ a také přítomností faktorů potlačujících Th1 i Th2 zánětlivé reakce, kterým je například IL-10 (Akdis *et al.*, 1998). Tyto tendence se mohou případně objevovat již před vznikem alergie a mohou signalizovat její budoucí vývoj. Časně projevy poruchy regulace imunitních reakcí by mohly sloužit jako prognostické znaky předcházející budoucí rozvoj alergie. Jak již bylo uvedeno, dosavadní výsledky získané v této oblasti jsou značně rozporuplné a jejich posouzení a interpretace vyžadují další podrobnější studium a testování velkého množství jedinců s různým stupněm rizika pozdějšího vzniku alergie. Příspěvkem k řešení této problematiky je také předkládaná diplomová práce.

Pro náš výzkum byly jako cytokiny podporující a charakterizující protialergickou Th1 imunitní odpověď vybrány IFN- γ , IL-2 a IL-12, proalergickou Th2 imunitní reakci IL-4, IL-5, IL-6 a IL-13 a regulační cytokiny IL-10 a TGF- β , které by mohly tlumit vznik alergické reakce. Dále byl sledován IL-17, v současné době hodně diskutovaný cytokin poměrně nově objevené buněčné subpopulace Th17, který by mohl hrát roli i v alergických onemocněních (Annunziato *et al.*, 2007).

Propojení celého výzkumu a záruku hodnověrnosti získaných dat tvořila stimulace polyklonálním aktivátorem PHA. Již dříve byla v naší laboratoři prokázána vyšší reaktivita CBMC dětí alergických matek po stimulaci PHA (Zizka *et al.*, 2007). V této studii byla tedy použita kultivace s PHA jako pozitivní kontrola tvorby cytokinů CBMC. Získané výsledky potvrzují dřívější zjištění o reaktivitě a přidávají další informaci: u většiny sledovaných cytokinů je jejich vznik vyšší u alergické skupiny po stimulaci PHA než u zdravé.

Tvorbu cytokinů IFN- γ , IL-10, IL-13 a TGF- β se podařilo porovnat na úrovni všech tří výše uvedených způsobů detekce. Výsledky námi získané ukazují v první řadě odlišnost získaných dat v závislosti na použité metodě. Tento jev není z naší strany nic nečekaného. Každá metodika sleduje jiné stádium tvorby daného cytokinu, a tudíž vzájemně nemusí nutně korelovat: qRT-PCR zaznamenává relativní kvantifikaci genové exprese založenou na izolaci a následné reverzní transkripci mRNA, která představuje velmi časnou reakci CBMC na stimulaci, nicméně již neprokazuje, v kterých buňkách k tvorbě mRNA dochází a zda dochází k translaci této mRNA; intracelulární barvení cytokinů a jejich detekce průtokovou cytometrií ukazuje již tvorbu proteinu a pomocí současného barvení buněčných povrchových znaků umožňuje stanovit typ buňky, která daný cytokin syntetizuje; ELISA jako představitel klasické imunoenzymatické metodiky měří již v absolutních hodnotách koncentraci cytokinu v supernatantu kultur CBMC - tento způsob zachycuje nejrealističtější situaci produkce cytokinů, ovšem může docházet i k detekci nefunkčních fragmentů s epitopy odpovídajícími použitým protilátkám (House, 2001), dále bylo popsáno, že po izolaci CBMC hustotní centrifugací (Ficoll-Paque) dochází v těchto kulturách ke zvýšené apoptóze buněk ovlivňující prostředí a stav stimulace. Pokud je mi známo, žádná v současnosti dostupná studie nepoužila více jak dvě z těchto metodik pro porovnání výsledků. Tato studie přispívá k objasnění skutečnosti, že výzkumy na stejných buněčných kulturách (CBMC), ovšem za použití rozličných způsobů detekce cytokinů, často nevykazují stejné výsledky a závěry.

Ačkoliv existuje rostoucí počet důkazů, že plod je během těhotenství vystaven alergenům (Szépfalusi *et al.*, 2000), hlavně z jídla, efekt tohoto jevu není ještě plně objasněn. Setkání s alergenem (v jakémkoliv věku) v normálních podmínkách nevede k senzibilizaci, ale spíše k navození tolerance. Je předmětem diskuze, zda časná setkání s neškodnými proteiny z budoucího životního prostředí není spíše fyziologické než patologické, obzvláště když je tento fenomén pozorován u signifikantní většiny dětí, bez ohledu na atopický status. Stejně jako v raném postnatálním období při absenci „signálů nebezpečí“ může být setkání s alergeny důležité pro navození tolerance (Prescott, 2006). Pozorované odlišnosti neonatálních imunitních odpovědí na alergeny jsou příčinou obtížnosti jejich interpretace. Zdá se, že tyto reakce nejsou příbuzné žádným klasickým maturovaným odpovědím paměťových buněk (Thornton *et al.*, 2004). Toto by mohlo spolu s vlivem rozdílné použité metodiky vysvětlovat diametrálně odlišné výsledky jednotlivých výzkumných skupin.

Studie na tato témata se začaly ve větší míře objevovat asi před 10 lety, kdy byla prokázána schopnost CBMC proliferovat v odpovědi na rozličné stimulatory - OVA, BLG (betalactoglobulin), BSA (boviní sérum albumin), pyl z břízy a trav a HDM (Jones *et al.*, 1996; Kopp *et al.*, 2000; Miles *et al.*, 1996; Van Duren-Schmidt *et al.*, 1997). Kondo *et al.* (1992) zjistili, že zvýšená proliferace CBMC po *in vitro* stimulaci potravními alergeny byla pozorována u alergické skupiny ve srovnání se skupinou zdravou (Miles *et al.*, 1996; Piastra *et al.*, 1994). Oponovala jim ovšem studie Kopp *et al.* (2001), která prokázala stejnou proliferační aktivitu CBMC po stimulaci alergeny, čímž tento faktor zpochybnili jako spolehlivý ukazatel pro následný vývoj alergického onemocnění. Naše studie navazuje na tyto kontroverzní poznatky sledováním tvorby cytokinů buňkami pupečnickové krve dětí zdravých a alergických matek po stimulaci alergeny - bojínkem, břízou a roztočem. Výsledky prokázaly velmi slabou schopnost uvedených běžných alergenů stimulovat CBMC k produkci cytokinů. Obecně lze říci, že všechny použité metodické přístupy potvrdily toto zjištění. Nejmarkantněji byla velice nízká produkce IFN- γ , IL-2, IL-4 a IL-10 pozorována na úrovni genové exprese pomocí qRT-PCR. U TGF- β , IL-10 a IL-4 se dokonce hodnoty relativní kvantifikace po stimulaci alergeny pohybovaly pod hladinou exprese nestimulovaných kontrol u obou skupin. Tento jev se vyskytoval i při stanovení množství cytokinů v supernatantech kultur CBMC po stimulaci alergeny imunoenzymatickou metodou ELISA, kdy byly také po stimulaci detekovány nižší koncentrace TGF- β , IL-13, IL-12 a IL-5 než u nestimulovaných kontrol. I při intracelulárním barvení buněk pupečnickové krve a následné analýze pomocí průtokové

cytometrie bylo v případě IL-10, IL-13 a TGF- β (po stimulaci BOJ, BRI a ROZ) naměřeno nižší procentuální zastoupení buněk pozitivních pro daný cytokin v CD4 pozitivní subpopulaci T lymfocytů než u nestimulovaných kontrol. Ačkoliv by se toto zjištění mohlo zdát překvapivé, existuje několik studií, které podporují naše zjištění: Rowe *et al.* (2007) za použití qPCR (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IFN- γ), Schaub *et al.* (2008) při měření metodou ELISA (IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, IL-13), Böttcher *et al.* (2006) také při využití metody ELISA (IFN- γ , IL-5, IL-10, IL-13), Sandberg *et al.* (2009) metodou ELISA (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IFN- γ). Je nutné mít na zřeteli, že ve všech výše uvedených případech byly naměřené hodnoty velmi nízké, a proto je jejich vzájemné porovnání značně problematické.

Velmi elegantní vysvětlení výsledků studií, které neměly problémy s detekcí cytokinů po kultivaci CBMC s alergeny, poskytl výzkum Eiwegger *et al.* (2008), jenž zjistil kontaminace stimulatorů lipopolysacharidem, což výrazně zvyšuje následnou produkci cytokinů a prokázal přítomnost tohoto endotoxinu v některých běžně dodávaných alergenech.

Běžné uspořádání metody ELISA neumožňuje svým detekčním limitem zachytit produkci IL-4 při specifické stimulaci alergeny (Holt *et al.*, 1992; Liao *et al.*, 1996; Prescott *et al.*, 1999; Warner *et al.*, 1994), ačkoliv při stimulaci nespecifickými polyklonálními mitogeny jsou koncentrace cytokinů dostatečně vysoké (Katamura *et al.*, 1995; Piccinni *et al.*, 1996). Tento problém byl odstraněn použitím qRT-PCR, které prokázalo přítomnost genové exprese IL-4 v CBMC kulturách stimulovaných alergeny, ovšem na velmi nízké hladině, kterou ELISA s méně citlivým detekčním limitem nebyla schopná zachytit (Lewis *et al.*, 1991; Liao *et al.*, 1996). Proto bylo v této studii použito k detekci produkce IL-4 v CBMC kulturách rovněž qRT-PCR. Tato metoda spolehlivě zachytila genovou expresi IL-4, která ale i přesto byla velmi nízká a nebyl zde žádný signifikantní rozdíl mezi skupinami dětí ani mezi jednotlivými (specifickými i nespecifickými) námi použitými stimulatory.

Studie Prescott *et al.* (1999) a Holt *et al.* (1992) naznačují, že u dětí alergických matek lze pozorovat pozdější vyžívání cytokinové odpovědi ve srovnání se zdravou skupinou. Analýza cytokinové odpovědi po stimulaci alergenem z roztoku CBMC dětí, které ve 2 letech vykazovaly jasné příznaky alergického onemocnění, ukázala nižší basální sekreci cytokinů v porovnání s dětmi bez těchto symptomů. Tento jev byl evidentní u IL-4 (RT-PCR), IL-6, IL-10 a IL-13 (ELISA) (Prescott *et al.*, 1999). Skupina Holt *et al.* (1992) zjistila, že děti s rizikem rozvoje atopie produkují méně IFN- γ a IL-4 než děti bez této

genetické zátěže, což bylo prokázáno i po stimulaci kultur CBMC polyklonálním aktivátorem (Rinas *et al.*, 1993; Warner *et al.*, 1994). Lange *et al.* (2003) při použití HDM a PHA jako stimulátorů pozorovali signifikantní rozdíl tvorby IFN- γ a IL-10 mezi skupinami s různým rizikem vzniku alergie, koncentrace IL-13 byla vyšší v supernatantech kultur CBMC alergické skupiny. Všechny výše zmíněné studie použily pro detekci koncentrace cytokinů v supernatantech kultur CBMC metodu ELISA. Náš výzkum má tu výhodu, že jsme srovnávali produkci IL-10, IL-13, IFN- γ a TGF- β všemi třemi námi použitými metodikami, takže jsme schopni porovnat odpovídající výsledky získané stejným způsobem (ELISA).

S použitím metody ELISA jsme detekovali vyšší koncentraci IL-13 u alergické skupiny po stimulaci PHA i alergeny (OVA, BOJ, BRI, ROZ), koncentrace IL-10 byla srovnatelná v obou skupinách a IFN- γ byl lehce vyšší u alergické skupiny po stimulaci PHA, při použití alergenů nebyly výsledky jednotné nejspíše díky velkému rozptylu velmi nízkých hodnot. Naše výsledky se tedy více blíží údajům skupiny Lange *et al.* (2003).

Vědecké skupiny zabývající se rozdíly v produkci cytokinů po stimulaci alergenů se rozdělují přibližně na dvě skupiny s protichůdnými výsledky. Jedni prokázali po stimulaci CBMC alergenů zvýšenou tvorbu IL-13 u alergické skupiny (Kopp *et al.*, 2001; Lange *et al.*, 2003; Ohshima *et al.*, 2002; van der Velden *et al.*, 2001) a zároveň většinou nižší hladinu IFN- γ (Kopp *et al.*, 2001; Gabrielsson *et al.*, 2001; Kondo *et al.*, 1998; van der Velden *et al.*, 2001), druzí nepozorují žádné signifikantní změny mezi skupinami většinou u všech jimi testovaných cytokinů (Lange *et al.*, 2003) (IFN- γ , IL-10) (Böttcher *et al.*, 2006) (IL-5, IL-10, IL-13) (Schaub *et al.*, 2008) (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IL-13) (Rowe *et al.*, 2007) (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IFN- γ). Výsledky naší studie se řadí k druhé skupině vědeckých týmů, protože jsme neprokázali žádný signifikantní rozdíl v produkci cytokinů (IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- γ , TGF- β) CBMC po stimulaci alergenů (OVA, BOJ, BRI, ROZ) mezi jednotlivými skupinami při použití všech nám dostupných metodických přístupů.

K diskuzi jsou výsledky tvorby IL-5, IL-6 a IL-17 po stimulaci alergenů (OVA, BOJ, BRI, ROZ). U cytokinů IL-5 (qRT-PCR) a IL-6 (ELISA) je viditelný trend zvýšené produkce u alergické skupiny, což souhlasí s výsledky skupiny van der Velden *et al.*, (2001). Ovšem při porovnání výsledků získaných qRT-PCR a metodou ELISA pro IL-5 docházíme k závěru, že se zvýšení počtu kopií mRNA pro tento cytokin již neodráží v následné produkci proteinu v kulturách CBMC a tedy jeho vyšší množství při genové expresi nejspíše neodpovídá následné reálné sekreci. Celkově vyšší koncentrace IL-6

v supernatantech kultur CBMC, která je pravděpodobně způsobena stresem při porodu (Sakuma *et al.*, 1998), umožňuje detekovat rozdíl v produkci cytokinu po stimulaci alergenů mezi alergickou a zdravou skupinou. Při sledování procentuálního zastoupení buněk produkujících IL-17 v CD4 pozitivní populaci T lymfocytů pupečnickové krve došlo k překvapivému zjištění zatím nepopsanému v žádné dostupné literatuře. Byl zde zachycen trend vyššího procenta buněk zdravé skupiny po ovlivnění libovolným z námi použitých stimulatorů. Jediná publikovaná studie detekce intracelulárně barveného IL-17 v pupečnickové krvi neprokázala žádný rozdíl v procentuálním zastoupením mezi alergickou a zdravou skupinou po stimulaci HDM (Schaub *et al.*, 2008). Námi pozorovaný jev by mohl být důsledkem pozdějšího vyžívání cytokinové odpovědi alergické skupiny popsané již Prescott *et al.* (1999) nebo například pozdější diferenciací Th17 buněčné populace, která IL-17 produkuje.

Z výsledků je tedy patrná existence jistých tendencí v rozdílech mezi skupinami dětí alergických a zdravých matek, které ale nejsou statisticky významné, protože získané hodnoty se pohybují na hranici detekčního limitu. Roli hraje také pozdější rozvoj alergického onemocnění, kdy ne u všech dětí alergických matek se skutečně vyvine alergie a naopak, i u dětí nealergických matek se může alergie rozvinout, i když s nižší pravděpodobností než u dětí alergických matek. Posoudit jaké změny mají skutečný prognostický význam je v plánu pracoviště v rámci longitudinálního sledování dětí zahrnutých do studie z hlediska následného rozvoje alergie v pozdějším věku.

6 SOUHRN

- Výsledky prokázaly velmi slabou schopnost uvedených běžných alergenů (bojínek, bříza, roztoč, ovalbumin) stimulovat CBMC k expresi cytokinů. Obecně lze říci, že všechny použité metodické přístupy potvrdily toto zjištění.
- Při sledování procentuálního zastoupení buněk tvořících IL-17 v CD4 pozitivní populaci T lymfocytů pupečnickové krve byl zachycen trend vyššího procenta buněk zdravé skupiny po ovlivnění libovolným z námi použitých stimulátorů.
- Neprokáali jsme žádný signifikantní rozdíl v produkci cytokinů (IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- γ , TGF- β) CBMC po stimulaci alergenů (OVA, BOJ, BRI, ROZ) mezi jednotlivými skupinami dětí zdravých a alergických matek při použití všech nám dostupných metodických přístupů.
- Imunitní potenciál plodu je defektní v mnoha ohledech a také vliv intrauterinní senzibilizace se jeví jako nízký, nicméně jej nelze vyloučit, protože byla prokázána možnost průchodu alergenů přes placentu, ačkoliv pravděpodobně prochází pouze malé množství, které není dostatečné pro stimulaci rozvíjejícího se imunitního systému.

7 SEZNAM LITERATURY

- Abramson, J., and Pecht, I. (2007). Regulation of the mast cell response to the type 1 Fc epsilon receptor. *Immunol Rev* 217, 231-254.
- Admyre, C., Teleme, E., Almqvist, N., Lötvall, J., Lahesmaa, R., Scheynius, A., and Gabrielsson, S. (2008). Exosomes - nanovesicles with possible roles in allergic inflammation. *Allergy* 63, 404-408.
- Akdis, C.A., Blesken, T., Akdis, M., Wüthrich, B., and Blaser, K. (1998). Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 102, 98-106.
- Alfvén, T., Braun-Fahrlander, C., Brunekreef, B., von Mutius, E., Riedler, J., Scheynius, A., van Hage, M., Wickman, M., Benz, M.R., Budde, J., et al. (2006). Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle--the PARSIFAL study. *Allergy* 61, 414-421.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Fili, L., Ferri, S., Frosali, F., et al. (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 204, 1849-1861.
- Barrett, E.G. (2008). Maternal influence in the transmission of asthma susceptibility. *Pulm Pharmacol Ther* 21, 474-484.
- Bellanti, J.A. (1998). Cytokines and allergic diseases: clinical aspects. *Allergy Asthma Proc* 19, 337-341.
- Bertino, E., Bisson, C., Martano, C., Coscia, A., Fabris, C., Monti, G., Testa, T., and Conti, A. (2006). Relationship between maternal- and fetal-specific IgE. *Pediatr Allergy Immunol* 17, 484-488.
- Bhavsar, P., Ahmad, T., and Adcock, I.M. (2008). The role of histone deacetylases in asthma and allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 121, 580-584.
- Björkstén, B. (1999). The intrauterine and postnatal environments. *J Allergy Clin Immunol* 104, 1119-1127.
- Bofill, M., Janossy, G., Janossa, M., Burford, G.D., Seymour, G.J., Wernet, P., and Kelemen, E. (1985). Human B cell development. II. Subpopulations in the human fetus. *J Immunol* 134, 1531-1538.
- Bostock, J. (1819). Case of a Periodical Affection of the Eyes and Chest. *Med Chir Trans* 10, 161-165.

- Brewis, R.A.L. (1990/1991). *Classic Papers in Asthma: Volumes One and Two*. London: Science Press Ltd. Citováno podle Jackson, M. (2001). Allergy: the making of a modern plague. *Clin Exp Allergy* 31, 1665-1671.
- Byrne, J.A., Stankovic, A.K., and Cooper, M.D. (1994). A novel subpopulation of primed T cells in the human fetus. *J Immunol* 152, 3098-3106.
- Call, M.E., and Wucherpfennig, K.W. (2005). The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annu Rev Immunol* 23, 101-125.
- Chan-Yeung, M., Ferguson, A., Chan, H., Dimich-Ward, H., Watson, W., Manfreda, J., and Becker, A. (1999). Umbilical cord blood mononuclear cell proliferative response to house dust mite does not predict the development of allergic rhinitis and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 104, 317-321.
- Chen, Z., Tato, C.M., Muul, L., Laurence, A., and O'Shea, J.J. (2007). Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis Rheum* 56, 2936-2946.
- Dealtry, G.B., O'Farrell, M.K., and Fernandez, N. (2000). The Th2 cytokine environment of the placenta. *Int Arch Allergy Immunol* 123, 107-119.
- Denham, S., Koppelman, G.H., Blakey, J., Wjst, M., Ferreira, M.A., Hall, I.P., and Sayers, I. (2008). Meta-analysis of genome-wide linkage studies of asthma and related traits. *Respir Res* 9, 38.
- Denison, F.C., Kelly, R.W., Calder, A.A., and Riley, S.C. (1998). Cytokine secretion by human fetal membranes, decidua and placenta at term. *Hum Reprod* 13, 3560-3565.
- Devereux, G., Barker, R.N., and Seaton, A. (2002). Antenatal determinants of neonatal immune responses to allergens. *Clin Exp Allergy* 32, 43-50.
- Ege, M.J., Bieli, C., Frei, R., van Strien, R.T., Riedler, J., Ublagger, E., Schram-Bijkerk, D., Brunekreef, B., van Hage, M., Scheynius, A., et al. (2006). Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. *J Allergy Clin Immunol* 117, 817-823.
- Eiwegger, T., Mayer, E., Brix, S., Schabussova, I., Dehlink, E., Bohle, B., Barkholt, V., and Szépfalusi, Z. (2008). Allergen specific responses in cord and adult blood are differentially modulated in the presence of endotoxins. *Clin Exp Allergy* 38, 1627-1634.
- Emanuel, M.B. (1988). Hay fever, a post industrial revolution epidemic: a history of its growth during the 19th century. *Clin Allergy* 18, 295-304.

- Faulk, W.P., Jeannet, M., Creighton, W.D., and Carbonara, A. (1974). Immunological studies of the human placenta. Characterization of immunoglobulins on trophoblastic basement membranes. *J Clin Invest* 54, 1011-1019.
- Fields, P.E., Kim, S.T., and Flavell, R.A. (2002). Cutting edge: changes in histone acetylation at the IL-4 and IFN-gamma loci accompany Th1/Th2 differentiation. *J Immunol* 169, 647-650.
- Forestier, F., Daffos, F., Catherine, N., Renard, M., and Andreux, J.P. (1991). Developmental hematopoiesis in normal human fetal blood. *Blood* 77, 2360-2363.
- Foster, C.A., Holbrook, K.A., and Farr, A.G. (1986). Ontogeny of Langerhans cells in human embryonic and fetal skin: expression of HLA-DR and OKT-6 determinants. *J Invest Dermatol* 86, 240-243.
- Fujii, Y., Okumura, M., Inada, K., Nakahara, K., and Matsuda, H. (1992). CD45 isoform expression during T cell development in the thymus. *Eur J Immunol* 22, 1843-1850.
- Fukamatsu, Y., Tomita, K., and Fukuta, T. (1984). Further evidence of prolactin production from human decidua and its transport across fetal membrane. *Gynecol Obstet Invest* 17, 309-316.
- Fukuoka, Y., Xia, H.Z., Sanchez-Muñoz, L.B., Dellinger, A.L., Escibano, L., and Schwartz, L.B. (2008). Generation of anaphylatoxins by human beta-tryptase from C3, C4, and C5. *J Immunol* 180, 6307-6316.
- Gill, T.J., Repetti, C.F., Metlay, L.A., Rabin, B.S., Taylor, F.H., Thompson, D.S., and Cortese, A.L. (1983). Transplacental immunization of the human fetus to tetanus by immunization of the mother. *J Clin Invest* 72, 987-996.
- Gitlin, D., and Biasucci, A. (1969). Development of gamma G, gamma A, gamma M, beta IC-beta IA, C 1 esterase inhibitor, ceruloplasmin, transferrin, hemopexin, haptoglobin, fibrinogen, plasminogen, alpha 1-antitrypsin, orosomucoid, beta-lipoprotein, alpha 2-macroglobulin, and prealbumin in the human conceptus. *J Clin Invest* 48, 1433-1446.
- Gould, H.J., and Sutton, B.J. (2008). IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* 8, 205-217.
- Han, P., McDonald, T., and Hodge, G. (2004). Potential immaturity of the T-cell and antigen-presenting cell interaction in cord blood with particular emphasis on the CD40-CD40 ligand costimulatory pathway. *Immunology* 113, 26-34.

Hanna, N., Hanna, I., Hleb, M., Wagner, E., Dougherty, J., Balkundi, D., Padbury, J., and Sharma, S. (2000). Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *J Immunol* 164, 5721-5728.

Hart, P.H. (2001). Regulation of the inflammatory response in asthma by mast cell products. *Immunol Cell Biol* 79, 149-153.

Hilkens, C.M., Vermeulen, H., van Neerven, R.J., Snijdewint, F.G., Wierenga, E.A., and Kapsenberg, M.L. (1995). Differential modulation of T helper type 1 (Th1) and T helper type 2 (Th2) cytokine secretion by prostaglandin E2 critically depends on interleukin-2. *Eur J Immunol* 25, 59-63.

Hollingsworth, J.W., Maruoka, S., Boon, K., Garantziotis, S., Li, Z., Tomfohr, J., Bailey, N., Potts, E.N., Whitehead, G., Brass, D.M., et al. (2008). In utero supplementation with methyl donors enhances allergic airway disease in mice. *J Clin Invest* 118, 3462-3469.

Holt, P.G. (2008). Prenatal versus postnatal priming of allergen specific immunologic memory: the debate continues. *J Allergy Clin Immunol* 122, 717-718.

Holt, P.G., and Jones, C.A. (2000). The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy* 55, 688-697.

Holt, P.G., and Macaubas, C. (1997). Development of long-term tolerance versus sensitisation to environmental allergens during the perinatal period. *Curr Opin Immunol* 9, 782-787.

Holt, P.G., Clough, J.B., Holt, B.J., Baron-Hay, M.J., Rose, A.H., Robinson, B.W., and Thomas, W.R. (1992). Genetic 'risk' for atopy is associated with delayed postnatal maturation of T-cell competence. *Clin Exp Allergy* 22, 1093-1099.

Holt, P.G., O'Keeffe, P., Holt, B.J., Upham, J.W., Baron-Hay, M.J., Suphioglu, C., Knox, B., Stewart, G.A., Thomas, W.R., and Sly, P.D. (1995). T-cell "priming" against environmental allergens in human neonates: sequential deletion of food antigen reactivity during infancy with concomitant expansion of responses to ubiquitous inhalant allergens. *Pediatr Allergy Immunol* 6, 85-90.

House, R.V. (2001). Cytokine measurement techniques for assessing hypersensitivity. *Toxicology* 158, 51-58.

Hübner, M.P., Larson, D., Torrero, M.N., Mueller, E., Shi, Y., Killoran, K.E., and Mitre, E. (2011). Anti-FcεR1 antibody injections activate basophils and mast cells and delay Type 1 diabetes onset in NOD mice. *Clin Immunol* 141, 205-217.

Hunt, D.W., Huppertz, H.I., Jiang, H.J., and Petty, R.E. (1994). Studies of human cord blood dendritic cells: evidence for functional immaturity. *Blood* 84, 4333-4343.

- Imada, M., Simons, F.E., Jay, F.T., and Hayglass, K.T. (1995). Allergen-stimulated interleukin-4 and interferon-gamma production in primary culture: responses of subjects with allergic rhinitis and normal controls. *Immunology* 85, 373-380.
- Jackson, M. (2001). Allergy: the making of a modern plague. *Clin Exp Allergy* 31, 1665-1671.
- Janossy, G., Bofill, M., Poulter, L.W., Rawlings, E., Burford, G.D., Navarrete, C., Ziegler, A., and Kelemen, E. (1986). Separate ontogeny of two macrophage-like accessory cell populations in the human fetus. *J Immunol* 136, 4354-4361.
- Janson, P.C., Winerdal, M.E., and Winqvist, O. (2009). At the crossroads of T helper lineage commitment-Epigenetics points the way. *Biochim Biophys Acta* 1790, 906-919.
- Jenmalm, M.C., Van Snick, J., Cormont, F., and Salman, B. (2001). Allergen-induced Th1 and Th2 cytokine secretion in relation to specific allergen sensitization and atopic symptoms in children. *Clin Exp Allergy* 31, 1528-1535.
- Jeschke, U., Mayr, D., Schiessl, B., Mylonas, I., Schulze, S., Kuhn, C., Friese, K., and Walzel, H. (2007). Expression of galectin-1, -3 (gal-1, gal-3) and the Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in normal, IUGR, preeclamptic and HELLP placentas. *Placenta* 28, 1165-1173.
- Joerink, M., Rindsjö, E., Stenius, F., Alm, J., Lilja, G., Grönlund, H., and Scheynius, A. (2009). Evidence for allergen-specific IgE of maternal origin in human placenta. *Allergy* 64, 905-912.
- Johnson, C.C., Ownby, D.R., and Peterson, E.L. (1996). Parental history of atopic disease and concentration of cord blood IgE. *Clin Exp Allergy* 26, 624-629.
- Jones, A.C., Miles, E.A., Warner, J.O., Colwell, B.M., Bryant, T.N., and Warner, J.A. (1996). Fetal peripheral blood mononuclear cell proliferative responses to mitogenic and allergenic stimuli during gestation. *Pediatr Allergy Immunol* 7, 109-116.
- Jones, C.A., Finlay-Jones, J.J., and Hart, P.H. (1997). Type-1 and type-2 cytokines in human late-gestation decidual tissue. *Biol Reprod* 57, 303-311.
- Jutel, M., Klunker, S., Akdis, M., Małolepszy, J., Thomet, O.A., Zak-Nejmark, T., Blaser, K., and Akdis, C.A. (2001). Histamine upregulates Th1 and downregulates Th2 responses due to different patterns of surface histamine 1 and 2 receptor expression. *Int Arch Allergy Immunol* 124, 190-192.
- Kamemura, N., Tada, H., Shimojo, N., Morita, Y., Kohno, Y., Ichioka, T., Suzuki, K., Kubota, K., Hiyoshi, M., and Kido, H. (2012). Intrauterine sensitization of allergen-

specific IgE analyzed by a highly sensitive new allergen microarray. *J Allergy Clin Immunol* 130, 113-121.e112.

Katamura, K., Tabata, Y., Oshima, Y., Shintaku, N., Yamauchi, Y., and Mayumi, M. (1995). Selective induction of interleukin-4- and interferon- γ -producing T cells from cord blood naive T cells. Effects of costimulatory signaling through CD28. *Int Arch Allergy Immunol* 106, 101-106.

Kay, A.B. (2000). *Allergic Disease*. London: Royal Society of Medicine Press.
Citováno podle Jackson, M. (2001). Allergy: the making of a modern plague. *Clin Exp Allergy* 31, 1665-1671.

Koenen, H.J., Smeets, R.L., Vink, P.M., van Rijssen, E., Boots, A.M., and Joosten, I. (2008). Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 112, 2340-2352.

Kondo, N., Kobayashi, Y., Shinoda, S., Kasahara, K., Kameyama, T., Iwasa, S., and Orii, T. (1992). Cord blood lymphocyte responses to food antigens for the prediction of allergic disorders. *Arch Dis Child* 67, 1003-1007.

Kondo, N., Kobayashi, Y., Shinoda, S., Takenaka, R., Teramoto, T., Kaneko, H., Fukao, T., Matsui, E., Kasahara, K., and Yokoyama, Y. (1998). Reduced interferon gamma production by antigen-stimulated cord blood mononuclear cells is a risk factor of allergic disorders--6-year follow-up study. *Clin Exp Allergy* 28, 1340-1344.

Kopp, M.V., Pichler, J., Halmerbauer, G., Kuehr, J., Frischer, T., Urbanek, R., and Szépfalusi, Z. (2000). Culture conditions for the detection of allergen-specific T-cell reactivity in cord blood: influence of cell number. *Pediatr Allergy Immunol* 11, 4-11.

Kopp, M.V., Zehle, C., Pichler, J., Szépfalusi, Z., Moseler, M., Deichmann, K., Forster, J., and Kuehr, J. (2001). Allergen-specific T cell reactivity in cord blood: the influence of maternal cytokine production. *Clin Exp Allergy* 31, 1536-1543.

Kraft, S., Randall, E., Wilhelm, M., and Lana, S. (2007). Development of a whole body magnetic resonance imaging protocol in normal dogs and canine cancer patients. *Vet Radiol Ultrasound* 48, 212-220.

Kumar, S., Verma, A.K., Das, M., and Dwivedi, P.D. (2012). Molecular mechanisms of IgE mediated food allergy. *Int Immunopharmacol* 13, 432-439.

Lange, J., Ngoumou, G., Berkenheide, S., Moseler, M., Mattes, J., Kuehr, J., and Kopp, M.V. (2003). High interleukin-13 production by phytohaemagglutinin- and Der p 1-stimulated cord blood mononuclear cells is associated with the subsequent development of atopic dermatitis at the age of 3 years. *Clin Exp Allergy* 33, 1537-1543.

- Lewis, D.B., Yu, C.C., Meyer, J., English, B.K., Kahn, S.J., and Wilson, C.B. (1991). Cellular and molecular mechanisms for reduced interleukin 4 and interferon-gamma production by neonatal T cells. *J Clin Invest* 87, 194-202.
- Liao, S.Y., Liao, T.N., Chiang, B.L., Huang, M.S., Chen, C.C., Chou, C.C., and Hsieh, K.H. (1996). Decreased production of IFN gamma and increased production of IL-6 by cord blood mononuclear cells of newborns with a high risk of allergy. *Clin Exp Allergy* 26, 397-405.
- Linch, D.C., Knott, L.J., Rodeck, C.H., and Huehns, E.R. (1982). Studies of circulating hemopoietic progenitor cells in human fetal blood. *Blood* 59, 976-979.
- Litonjua, A.A., Carey, V.J., Burge, H.A., Weiss, S.T., and Gold, D.R. (1998). Parental history and the risk for childhood asthma. Does mother confer more risk than father? *Am J Respir Crit Care Med* 158, 176-181.
- Liu, C.A., Wang, C.L., Chuang, H., Ou, C.Y., Hsu, T.Y., and Yang, K.D. (2003). Prediction of elevated cord blood IgE levels by maternal IgE levels, and the neonate's gender and gestational age. *Chang Gung Med J* 26, 561-569.
- Liu, E., Tu, W., Law, H.K., and Lau, Y.L. (2001). Decreased yield, phenotypic expression and function of immature monocyte-derived dendritic cells in cord blood. *Br J Haematol* 113, 240-246.
- Loibichler, C., Pichler, J., Gerstmayr, M., Bohle, B., Kisst, H., Urbanek, R., and Szépfalusi, Z. (2002). Materno-fetal passage of nutritive and inhalant allergens across placentas of term and pre-term deliveries perfused in vitro. *Clin Exp Allergy* 32, 1546-1551.
- Lorenz, M., Jung, S., and Radbruch, A. (1995). Switch transcripts in immunoglobulin class switching. *Science* 267, 1825-1828.
- MacGlashan, D. (2005). IgE and FcεRI regulation. *Clin Rev Allergy Immunol* 29, 49-60.
- Mackenzie, M. (1887). *Hay Fever and Paroxysmal Sneezing*. London: J & A Churchill
- Malek, A., Sager, R., Kuhn, P., Nicolaides, K.H., and Schneider, H. (1996). Evolution of maternofetal transport of immunoglobulins during human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 36, 248-255.
- Meltzer, S.J. (1910). Bronchial asthma as a phenomenon of anaphylaxis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 55, 1021-1024.
- Migliaccio, G., Migliaccio, A.R., Petti, S., Mavilio, F., Russo, G., Lazzaro, D., Testa, U., Marinucci, M., and Peschle, C. (1986). Human embryonic hemopoiesis. Kinetics of

progenitors and precursors underlying the yolk sac---liver transition. *J Clin Invest* 78, 51-60.

Miles, E.A., Warner, J.A., Jones, A.C., Colwell, B.M., Bryant, T.N., and Warner, J.O. (1996). Peripheral blood mononuclear cell proliferative responses in the first year of life in babies born to allergic parents. *Clin Exp Allergy* 26, 780-788.

Miller, D.L., Hiravonen, T., and Gitlin, D. (1973). Synthesis of IgE by the human conceptus. *J Allergy Clin Immunol* 52, 182-188.

Miller, R.L., and Ho, S.M. (2008). Environmental epigenetics and asthma: current concepts and call for studies. *Am J Respir Crit Care Med* 177, 567-573.

Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Sullivan, M.L., Stolz, D.B., Papworth, G.D., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Wang, Z., Watkins, S.C., et al. (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104, 3257-3266.

Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989). Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol* 46, 111-147.

Namikawa, R., Mizuno, T., Matsuoka, H., Fukami, H., Ueda, R., Itoh, G., Matsuyama, M., and Takahashi, T. (1986). Ontogenic development of T and B cells and non-lymphoid cells in the white pulp of human spleen. *Immunology* 57, 61-69.

Noakes, P.S., Hale, J., Thomas, R., Lane, C., Devadason, S.G., and Prescott, S.L. (2006). Maternal smoking is associated with impaired neonatal toll-like-receptor-mediated immune responses. *Eur Respir J* 28, 721-729.

Noga, O., Brunnée, T., Schäper, C., and Kunkel, G. (1999). Heparin, derived from the mast cells of human lungs is responsible for the generation of kinins in allergic reactions due to the activation of the contact system. *Int Arch Allergy Immunol* 120, 310-316.

Novato-Silva, E., Gazzinelli, G., and Colley, D.G. (1992). Immune responses during human schistosomiasis mansoni. XVIII. Immunologic status of pregnant women and their neonates. *Scand J Immunol* 35, 429-437.

Ohshima, Y., Yasutomi, M., Omata, N., Yamada, A., Fujisawa, K., Kasuga, K., Hiraoka, M., and Mayumi, M. (2002). Dysregulation of IL-13 production by cord blood CD4⁺ T cells is associated with the subsequent development of atopic disease in infants. *Pediatr Res* 51, 195-200.

Oryszczyn, M.P., Annesi-Maesano, I., Campagna, D., Sahuquillo, J., Huel, G., and Kauffmann, F. (1999). Head circumference at birth and maternal factors related to cord blood total IgE. *Clin Exp Allergy* 29, 334-341.

- Palfi, M., and Selbing, A. (1998). Placental transport of maternal immunoglobulin G. *Am J Reprod Immunol* 39, 24-26.
- Palomares, O., Yaman, G., Azkur, A.K., Akkoc, T., Akdis, M., and Akdis, C.A. (2010). Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur J Immunol* 40, 1232-1240.
- Papadogiannakis, N. (1997). Traffic of leukocytes through the maternofetal placental interface and its possible consequences. *Curr Top Microbiol Immunol* 222, 141-157.
- Pastorelli, G., Rousset, F., Pène, J., Peronne, C., Roncarolo, M.G., Tovo, P.A., and de Vries, J.E. (1990). Cord blood B cells are mature in their capacity to switch to IgE-producing cells in response to interleukin-4 in vitro. *Clin Exp Immunol* 82, 114-119.
- Pearlman, D.S. (1999). Pathophysiology of the inflammatory response. *J Allergy Clin Immunol* 104, S132-137.
- Peters, J.L., Suglia, S.F., Platts-Mills, T.A., Hosen, J., Gold, D.R., and Wright, R.J. (2009). Relationships among prenatal aeroallergen exposure and maternal and cord blood IgE: project ACCESS. *J Allergy Clin Immunol* 123, 1041-1046.
- Pfefferle, P.I., Sel, S., Ege, M.J., Büchele, G., Blümer, N., Krauss-Etschmann, S., Herzum, I., Albers, C.E., Lauener, R.P., Roponen, M., et al. (2008). Cord blood allergen-specific IgE is associated with reduced IFN-gamma production by cord blood cells: the Protection against Allergy-Study in Rural Environments (PASTURE) Study. *J Allergy Clin Immunol* 122, 711-716.
- Piastra, M., Stabile, A., Fioravanti, G., Castagnola, M., Pani, G., and Ria, F. (1994). Cord blood mononuclear cell responsiveness to beta-lactoglobulin: T-cell activity in 'atopy-prone' and 'non-atopy-prone' newborns. *Int Arch Allergy Immunol* 104, 358-365.
- Piccinni, M.P., Beloni, L., Giannarini, L., Livi, C., Scarselli, G., Romagnani, S., and Maggi, E. (1996). Abnormal production of T helper 2 cytokines interleukin-4 and interleukin-5 by T cells from newborns with atopic parents. *Eur J Immunol* 26, 2293-2298.
- Platts-Mills, T.A., and Woodfolk, J.A. (2000). Cord blood proliferative responses to inhaled allergens: is there a phenomenon? *J Allergy Clin Immunol* 106, 441-443.
- Platts-Mills, T.A., Rakes, G., and Heymann, P.W. (2000). The relevance of allergen exposure to the development of asthma in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 105, S503-508.

- Polansky, J.K., Kretschmer, K., Freyer, J., Floess, S., Garbe, A., Baron, U., Olek, S., Hamann, A., von Boehmer, H., and Huehn, J. (2008). DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol* 38, 1654-1663.
- Prescott, S.L. (2006). Maternal allergen exposure as a risk factor for childhood asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 6, 75-80.
- Prescott, S.L. (2010). Allergic disease: understanding how in utero events set the scene. *Proc Nutr Soc* 69, 366-372.
- Prescott, S.L. (2011). The influence of early environmental exposures on immune development and subsequent risk of allergic disease. *Allergy* 66 Suppl 95, 4-6.
- Prescott, S.L., and Clifton, V. (2009). Asthma and pregnancy: emerging evidence of epigenetic interactions in utero. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 9, 417-426.
- Prescott, S.L., Macaubas, C., Holt, B.J., Smallacombe, T.B., Loh, R., Sly, P.D., and Holt, P.G. (1998). Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol* 160, 4730-4737.
- Prescott, S.L., Macaubas, C., Smallacombe, T., Holt, B.J., Sly, P.D., and Holt, P.G. (1999). Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 353, 196-200.
- Prescott, S.L., Macaubas, C., Smallacombe, T., Holt, B.J., Sly, P.D., and Holt, P.G. (1999). Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 353, 196-200.
- Prescott, S.L., Macaubas, C., Yabuhara, A., Venaille, T.J., Holt, B.J., Habre, W., Loh, R., Sly, P.D., and Holt, P.G. (1997). Developing patterns of T cell memory to environmental allergens in the first two years of life. *Int Arch Allergy Immunol* 113, 75-79.
- Renz-Polster, H., David, M.R., Buist, A.S., Vollmer, W.M., O'Connor, E.A., Frazier, E.A., and Wall, M.A. (2005). Caesarean section delivery and the risk of allergic disorders in childhood. *Clin Exp Allergy* 35, 1466-1472.
- Rinas, U., Horneff, G., and Wahn, V. (1993). Interferon-gamma production by cord-blood mononuclear cells is reduced in newborns with a family history of atopic disease and is independent from cord blood IgE-levels. *Pediatr Allergy Immunol* 4, 60-64.
- Rindsjö, E., and Scheynius, A. (2010). Mechanisms of IgE-mediated allergy. *Exp Cell Res* 316, 1384-1389.

- Rindsjö, E., Joerink, M., Papadogiannakis, N., and Scheynius, A. (2010). IgE in the human placenta: why there? *Allergy* 65, 554-560.
- Roth, I., Corry, D.B., Locksley, R.M., Abrams, J.S., Litton, M.J., and Fisher, S.J. (1996). Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J Exp Med* 184, 539-548.
- Rowe, J., Kusel, M., Holt, B.J., Suriyaarachchi, D., Serralha, M., Hollams, E., Yerkovich, S.T., Subrata, L.S., Ladyman, C., Sadowska, A., et al. (2007). Prenatal versus postnatal sensitization to environmental allergens in a high-risk birth cohort. *J Allergy Clin Immunol* 119, 1164-1173.
- Saji, F., Samejima, Y., Kamiura, S., and Koyama, M. (1999). Dynamics of immunoglobulins at the feto-maternal interface. *Rev Reprod* 4, 81-89.
- Sakuma, I., Nishida, H., Takahashi, N., and Oishi, M. (1998). The Influence of the Stress during the Birth Process on the Changing Pattern of Interleukin-6 (IL-6) of the Neonate [daggar] 1121. *Pediatr Res* 43, 192-192.
- Sandberg, M., Frykman, A., Ernerudh, J., Berg, G., Matthiesen, L., Ekerfelt, C., Nilsson, L.J., and Jenmalm, M.C. (2009). Cord blood cytokines and chemokines and development of allergic disease. *Pediatr Allergy Immunol* 20, 519-527.
- Sandford, A., Weir, T., and Paré, P. (1996). The genetics of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 153, 1749-1765.
- Schaub, B., Liu, J., Höppler, S., Haug, S., Sattler, C., Lluís, A., Illi, S., and von Mutius, E. (2008). Impairment of T-regulatory cells in cord blood of atopic mothers. *J Allergy Clin Immunol* 121, 1491-1499, 1499.e1491-1413.
- Schelonka, R.L., Yoder, B.A., desJardins, S.E., Hall, R.B., and Butler, J. (1994). Peripheral leukocyte count and leukocyte indexes in healthy newborn term infants. *J Pediatr* 125, 603-606.
- Siegrist, C.A. (1997). Potential advantages and risks of nucleic acid vaccines for infant immunization. *Vaccine* 15, 798-800.
- Siemasko, K., Chong, A.S., Jäck, H.M., Gong, H., Williams, J.W., and Finnegan, A. (1998). Inhibition of JAK3 and STAT6 tyrosine phosphorylation by the immunosuppressive drug leflunomide leads to a block in IgG1 production. *J Immunol* 160, 1581-1588.
- Silverstein, A.M. (1979). History of immunology. *Cell Immunol* 42, 1-2.
- Smillie, F.I., Elderfield, A.J., Patel, F., Cain, G., Tavenier, G., Brutsche, M., Craven, M., Custovic, A., and Woodcock, A. (2001). Lymphoproliferative responses in cord

blood and at one year: no evidence for the effect of in utero exposure to dust mite allergens. *Clin Exp Allergy* 31, 1194-1204.

Song, F., Mahmood, S., Ghosh, S., Liang, P., Smiraglia, D.J., Nagase, H., and Held, W.A. (2009). Tissue specific differentially methylated regions (TDMR): Changes in DNA methylation during development. *Genomics* 93, 130-139.

Sorg, R.V., Kögler, G., and Wernet, P. (1999). Identification of cord blood dendritic cells as an immature CD11c- population. *Blood* 93, 2302-2307.

Stites, D.P., and Pavia, C.S. (1979). Ontogeny of human T cells. *Pediatrics* 64, 795-802.

Su, R.C., Becker, A.B., Kozyrskyj, A.L., and Hayglass, K.T. (2008). Epigenetic regulation of established human type 1 versus type 2 cytokine responses. *J Allergy Clin Immunol* 121, 57-63.e53.

Szekeres-Bartho, J., and Wegmann, T.G. (1996). A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *J Reprod Immunol* 31, 81-95.

Szépfolusi, Z., Pichler, J., Elsässer, S., van Duren, K., Ebner, C., Bernaschek, G., and Urbanek, R. (2000).

Thornton, C.A., Upham, J.W., Wikström, M.E., Holt, B.J., White, G.P., Sharp, M.J., Sly, P.D., and Holt, P.G. (2004). Functional maturation of CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺CD45RA⁺ T regulatory cells in human neonatal T cell responses to environmental antigens/allergens. *J Immunol* 173, 3084-3092.

Till, S., Durham, S., Dickason, R., Huston, D., Bungre, J., Walker, S., Robinson, D., Kay, A.B., and Corrigan, C. (1997a). IL-13 production by allergen-stimulated T cells is increased in allergic disease and associated with IL-5 but not IFN-gamma expression. *Immunology* 91, 53-57.

Till, S., Walker, S., Dickason, R., Huston, D., O'Brien, F., Lamb, J., Kay, A.B., Corrigan, C., and Durham, S. (1997b). IL-5 production by allergen-stimulated T cells following grass pollen immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Immunol* 110, 114-121.

Trompette, A., Divanovic, S., Visintin, A., Blanchard, C., Hegde, R.S., Madan, R., Thorne, P.S., Wills-Karp, M., Gioannini, T.L., Weiss, J.P., et al. (2009). Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature* 457, 585-588.

Truong, M.J., Gruart, V., Kusnierz, J.P., Papin, J.P., Loiseau, S., Capron, A., and Capron, M. (1993). Human neutrophils express immunoglobulin E (IgE)-binding

proteins (Mac-2/epsilon BP) of the S-type lectin family: role in IgE-dependent activation. *J Exp Med* 177, 243-248.

Tucci, A., Mouzaki, A., James, H., Bonnefoy, J.Y., and Zubler, R.H. (1991). Are cord blood B cells functionally mature? *Clin Exp Immunol* 84, 389-394.

Uthoff, H., Spenner, A., Reckelkamm, W., Ahrens, B., Wölk, G., Hackler, R., Hardung, F., Schaefer, J., Scheffold, A., Renz, H., *et al.* (2003). Critical role of preconceptional immunization for protective and nonpathological specific immunity in murine neonates. *J Immunol* 171, 3485-3492.

Valenta, R., and Kraft, D. (2002). From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 14, 718-727.

van der Velden, V.H., Laan, M.P., Baert, M.R., de Waal Malefyt, R., Neijens, H.J., and Savelkoul, H.F. (2001). Selective development of a strong Th2 cytokine profile in high-risk children who develop atopy: risk factors and regulatory role of IFN-gamma, IL-4 and IL-10. *Clin Exp Allergy* 31, 997-1006.

Van Duren-Schmidt, K., Pichler, J., Ebner, C., Bartmann, P., Förster, E., Urbanek, R., and Szépfalusi, Z. (1997). Prenatal contact with inhalant allergens. *Pediatr Res* 41, 128-131.

von Hoegen, P., Sarin, S., and Krowka, J.F. (1995). Deficiency in T cell responses of human fetal lymph node cells: a lack of accessory cells. *Immunol Cell Biol* 73, 353-361.

Waite, K.J. (1995). Blackley and the development of hay fever as a disease of civilization in the nineteenth century. *Med Hist* 39, 186-196.

Wang, J., and Maldonado, M.A. (2006). The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol* 3, 255-261.

Warner, J.A., Jones, C.A., Jones, A.C., Miles, E.A., Francis, T., and Warner, J.O. (1997). Immune responses during pregnancy and the development of allergic disease. *Pediatr Allergy Immunol* 8, 5-10.

Warner, J.A., Miles, E.A., Jones, A.C., Quint, D.J., Colwell, B.M., and Warner, J.O. (1994). Is deficiency of interferon gamma production by allergen triggered cord blood cells a predictor of atopic eczema? *Clin Exp Allergy* 24, 423-430.

Wegmann, T.G., Lin, H., Guilbert, L., and Mosmann, T.R. (1993). Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 14, 353-356.

- Weinberg, E.D. (1984). Pregnancy-associated depression of cell-mediated immunity. *Rev Infect Dis* 6, 814-831.
- White, G.P., Watt, P.M., Holt, B.J., and Holt, P.G. (2002). Differential patterns of methylation of the IFN-gamma promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN-gamma gene expression between human neonatal and adult CD45RO- T cells. *J Immunol* 168, 2820-2827.
- Williams, T.J., Jones, C.A., Miles, E.A., Warner, J.O., and Warner, J.A. (2000). Fetal and neonatal IL-13 production during pregnancy and at birth and subsequent development of atopic symptoms. *J Allergy Clin Immunol* 105, 951-959.
- Wong, O.H., Huang, F.P., and Chiang, A.K. (2005). Differential responses of cord and adult blood-derived dendritic cells to dying cells. *Immunology* 116, 13-20.
- Yamaoka, A., Kuwabara, I., Frigeri, L.G., and Liu, F.T. (1995). A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. *J Immunol* 154, 3479-3487.
- Yu, M., Fredrikson, S., Link, J., and Link, H. (1995). High numbers of autoantigen-reactive mononuclear cells expressing interferon-gamma (IFN-gamma), IL-4 and transforming growth factor-beta (TGF-beta) are present in cord blood. *Clin Exp Immunol* 101, 190-196.
- Zizka, J., Hrdý, J., Lodinová-Zádníková, R., Kocourková, I., Novotná, O., Sterzl, I., and Prokesová, L. (2007). Effect of breast milk of healthy and allergic mothers on in vitro stimulation of cord blood lymphocytes. *Pediatr Allergy Immunol* 18, 486-494.